

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Filogeografia de *Terpides sooretamae* Boldrini & Salles
(Ephemeroptera: Leptophlebiidae)

Evandro Apolinario Rizzi

Vitória, ES

Março, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Filogeografia de *Terpides sooretamae* Boldrini & Salles
(Ephemeroptera: Leptophlebiidae)

Evandro Apolinario Rizzi

Orientador: Prof. D. Sc. Frederico Falcão Salles

Co-orientadora: Prof.^a D. Sc. Roberta Paresque

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Vitória, ES

Março, 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Rizzi, Evandro Apolinario, 1989-
R627f Filogeografia de *Terpides sooretamae* Boldrini & Salles
(Ephemeroptera: Leptophlebiidae) / Evandro Apolinario Rizzi. –
2016.
78 f. : il.

Orientador: Frederico Falcão Salles.
Coorientador: Roberta Paresque.
Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Dispersão. 2. Fluxo gênico. 3. Diversidade biológica. 4.
Filogeografia. I. Salles, Frederico Falcão. II. Paresque, Roberta.
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

Evandro Apolinario Rizzi

**“Filogeografia de *Terpides sooretamae* Boldrini & Salles
(Ephemeroptera: Leptophlebiidae)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em 11 de março de 2016.

Comissão Examinadora:



Dr. Frederico Falcão Salles
Orientador e Presidente da Comissão - UFES



Dra. Leonora Pires Costa
Membro Titular Interno - UFES



Dr. Vander Calmon Tosta
Membro Titular Externo - CEUNES/UFES

“Em algum lugar, alguma coisa incrível
está esperando para ser conhecida.”
(Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

Não consigo imaginar em como seria elaborar qualquer tipo de trabalho acadêmico absolutamente sozinho. Apesar de sua natureza individual, uma dissertação é o resultado de um trabalho de várias mãos: colaborações, dicas, empréstimo/doação de material, até mesmo apoio emocional, entre outros. Neste momento em que escrevo, o sentimento que me veio foi de gratidão sincera. Se por acaso algum nome for omitido, peço mil desculpas. Mas quero deixar aqui a certeza de que eu dedico um “muito obrigado” a cada um que acreditou e me apoiou neste projeto, direta ou indiretamente.

Em primeiro lugar à minha família, pela paciência e apoio dados durante esses dois anos de mestrado, na pessoa de minha mãe, Alba, e de Jacimara e Pedro, minha irmã e meu cunhado. E às crianças Yasmin e Miguel, meus dois sobrinhos: eles me fizeram rir e me sentir criança em vários momentos. *Kids*, o tio Evandro ama vocês!

Àqueles que me ajudaram na minha estadia em Vitória no primeiro semestre de curso: meu tio Antônio e sua esposa, Jerusa, que me acolheram nos momentos em que precisei ir à “Ilha do Mel”, incluindo as provas de seleção, matrícula e os primeiros dias de aula. Ao Sr. Edson Scárdua (Edinho) e esposa, que dispuseram de seu precioso tempo várias vezes para me ajudar a resolver problemas rotineiros na capital capixaba.

Ainda em Vitória, agradeço aos novos amigos que fiz por lá, em especial ao Cristiano Caliman e à Mariana Santolin. Obrigado por me apresentarem aos agitos da noite capixaba, pelas conversas, pelos jogos do Brasil na Copa do Mundo, pelos filmes *cult* no Cine Jardins e, principalmente, por me orientarem quando eu precisava ir ao labiríntico bairro de Jardim da Penha! (risos)

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Animal (PPGBAN-UFES), de maneira especial àqueles que contribuíram com minha

formação nas disciplinas e nas apresentações de Seminários. O que aprendi com todos vocês contribuiu de maneira significativa não só para melhorar cada vez mais meu projeto de pesquisa, mas também para minha formação intelectual como biólogo.

Aos colegas da turma 2014/1, pelos vários momentos que passamos: nas disciplinas, nas apresentações de Seminários (um tentando acalmar o outro, é verdade...) e na Zoologia de Campo, na Estação Biológica de Santa Lúcia em Santa Teresa/ES. Pena que não foi muito tempo, pois em maior parte fiquei em São Mateus para desenvolver o projeto de mestrado; mas tenho certeza que fiz amigos, e espero que possamos nos contatar mais vezes no futuro.

Aos servidores do SIP – Secretaria Integrada dos Programas de Pós-Graduação, Centro de Ciências Humanas e Naturais/UFES – pelo apoio com as questões burocráticas do curso, em especial ao Ariel Sessa, sempre muito cordial e diligente, e ao coordenador do PPGBAN, Prof. D. Sc. Sérgio Lucena Mendes. Também à equipe da SUPGRAD – Secretaria Única de Pós-Graduação, Centro Universitário Norte do Espírito Santo/UFES – que me ajudou bastante com os mesmos assuntos no Campus de São Mateus.

Aos professores D. Sc. Ana Paula C. Farro e D. Sc. Vander Calmon Tosta, por cederem o Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA-Ceunes/UFES) para os meus experimentos, e à então técnica do LGCA, M. Sc. Geórgia de Brito V. Félix. À Téc. Eliane Gonçalves Pina (Laboratório de Biologia Celular e Genética - CEUNES/UFES) pelo suporte dado quando da utilização da autoclave para esterilização do material de laboratório. À equipe do Núcleo de Genética Aplicada à Conservação da Biodiversidade (NGACB-UFES), na pessoa dos seus responsáveis, os professores D. Sc. Yuri Luiz Reis Leite, D. Sc. Leonora Pires Costa e D. Sc. Valéria Fagundes, e da bióloga M. Sc. Juliana de Freitas Justino. Nessas oportunidades, tive o auxílio da Marina Monjardim, que me ajudou nas demais ocasiões em que precisei e acabou se tornando mais uma amiga que fiz durante o mestrado.

Ao Prof. D. Sc. Lucas Lima (UESPI), por me acompanhar nas minhas coletas em Pernambuco e Alagoas, ao seu orientador na época, o Prof. D. Sc. Ulisses Pinheiro, por me acolher em seu Laboratório de Porifera (LABPOR-UFPE), onde realizei a identificação dos indivíduos recém coletados, e aos seus alunos, que me receberam como um verdadeiro colega. Agradeço ainda à M. Sc. Fabiana C. Massariol (UFES), minha colega no LabSEI, por me acompanhar nas coletas na região sul do Espírito Santo. Ao Prof. D. Sc. Rafael Boldrini (UFRR) pela doação de espécimes de *Terpides* e *Fittkaulus* da região Norte, ao M. Sc. Leandro Brasil (UNEMAT) pela doação dos espécimes do Mato Grosso, e ao M. Sc. Fábio Henrique da Silva (UFES) pelos espécimes de Mato Grosso do Sul e pelas informações sobre a região amostrada. Ao geólogo Marx Engel Martins (UFES), pela disponibilidade em trabalhar na elaboração do mapa de ocorrência.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos (LabSEI-Ceunes/UFES) pela convivência no dia-a-dia da pesquisa acadêmica, pelas conversas, cafezinhos, até mesmo pelas discussões (não poucas).

Quero agradecer a um trio, que junto comigo formou uma “panelinha”: Keyla Cruz, Taís Almeida e Rayner Paresqui, vocês são especiais! Muito obrigado por todos os momentos, dentro ou fora do laboratório, em que conversamos, rimos (mas rimos muito!), discutimos projetos, falamos da vida, do mundo e tudo o mais. Nossa amizade vai bem além do mestrado, tenham certeza disso!

E por falar em pessoas especiais, quero dedicar um “muito obrigado” a um certo casal por me fazer parte de sua vida, chamando-me para ser seu padrinho de casamento: ao Murilo Pereira do Nascimento, pela amizade e por encontrar em São Mateus alguém que também curte poucas palavras e um bom *hard rock* (risos). E à Cris (M. Sc. Cristiane Alves da Silva do Nascimento – UFES) agradeço não apenas pela ajuda com a elaboração de mapas, mas também por ser minha grande amiga desde a graduação, no Ceunes/UFES.

À M. Sc. Jeane M. C. do Nascimento e ao M. Sc. Patrik Barcelos (INPA – Manaus/AM), também amigos dos tempos de graduação. Mesmo na distante Manaus, a Jê, como gosto de chamá-la, me chamava no *chat* para saber de mim e dava dicas de Filogeografia, além de me fazer dar boas risadas. Obrigado, meus amigos (quase) manauaras! ÉGUA, MANO! ...

Aos professores membros da banca avaliadora, pela disposição em ler e colaborar para a qualidade desta dissertação.

Às agências financiadoras deste projeto: à CAPES pela bolsa do Programa de Demanda Social e pelo auxílio PROAP. À FAPES, com o edital Biodiversidade do Espírito Santo, projeto “Diversidade e Taxonomia de Insetos Aquáticos na Porção Capixaba da Bacia do Rio Doce”. Ao CNPq, com o edital Universal: “Sistemática e taxonomia de Leptophlebiidae Neotropical (Insecta: Ephemeroptera): um estudo integrando dados moleculares e morfológicos”.

E a melhor parte ficou para o final. Meus últimos agradecimentos vão para duas pessoas que foram de primordial importância para a realização deste trabalho:

À Prof.^a D. Sc. Roberta Paresque, minha co-orientadora: mal a conhecia pessoalmente quando comecei o mestrado, mas já “considerava pacas” (risos). Desde a graduação, sempre que ia a Vitória ouvia falar muito bem da Roberta, como também tive a oportunidade de assistir a uma palestra sua em evento organizado pelo curso, até que se tornou minha grande colaboradora na pós-graduação. Muito obrigado pela atenção dispensada, em ocasiões nas quais confesso que tive de deixar minha timidez de lado para poder ter sua ajuda sempre generosa na própria casa, em pleno feriado e por mais de uma vez, seja nos procedimentos laboratoriais, nas análises e na elaboração da versão final da dissertação. Roberta, meu muito obrigado!

Ao Prof. D. Sc. Frederico Falcão Salles, meu orientador e grande amigo. Fred, desde o

primeiro dia de aula na graduação vi que você seria um professor diferenciado dos outros. Conseguiu associar seu jeitão sério e calado, digno de um dos maiores especialistas em Ephemeroptera da atualidade, com uma aura de garotão jovem e “zuer” (inclusive, aposto que vai me “zuar” ao ler este agradecimento!). Obrigado pela aceitação em me orientar, mesmo com as primeiras negociações enquanto você estava em outro país, em conversas pela *internet* marcadas com a precisão dos relógios suíços. Obrigado pelos momentos difíceis no mestrado, nos quais você, com uma calma impressionante, me tranquilizava e me fazia enxergar uma luz no fim do túnel. Mas obrigado, mesmo, por tudo que aprendi contigo: olhando para trás, percebi que os Ephemeroptera sempre estiveram presentes na minha formação. E tudo isso foi graças a você! Espero que seja cada vez mais reconhecido, e não só pelo grande cientista que você se tornou, mas principalmente pela grandeza de espírito e pelo otimismo, tão necessários neste mundo frio e caótico no qual vivemos. Fred, muito obrigado!

Nota à banca examinadora: as citações e referências deste trabalho seguirão
as normas da revista *Molecular Ecology*.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	9
1. <i>Amostras</i>	9
2. <i>Da extração de DNA ao sequenciamento</i>	12
3. <i>Análises</i>	13
RESULTADOS	15
1. <i>Testes de saturação</i>	15
2. <i>AMOVA (Análise de Variância Molecular)</i>	15
3. <i>Descritores da variabilidade genética e composição das sequências</i>	20
4. <i>Distância par-a-par (p-distance)</i>	22
5. <i>Redes de haplótipos</i>	25
6. <i>Fluxo gênico, testes de neutralidade e distribuição mismatch</i>	29
7. <i>Inferências filogenéticas</i>	40
DISCUSSÃO	42
1. <i>Fluxo gênico e a dinâmica das populações</i>	42
2. <i>Dispersão</i>	45
3. <i>Identidade de <i>Te. sooretamae</i>: presença de mais de uma espécie?</i>	46
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICES	56

Apêndice I. Relação dos indivíduos utilizados que tiveram ao menos uma das regiões do DNA mitocondrial amplificado, com respectivo número de tombo na CZNC, número do espécime e localidades amostradas	56
Apêndice II. Lista de haplótipos dos genes COI e COII (Apenas para <i>Terpides sooretamae</i>)	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos e populações definidos *a priori* para as análises.

Tabela 2. Cenário A: Regiões (Sudeste X Nordeste X Mato Grosso X Mato Grosso do Sul) – COI.

Tabela 3. Cenário B: Rio Doce como barreira - COI.

Tabela 4. Cenário C: Mata Atlântica X Cerrado - COI.

Tabela 5. Cenário A: Regiões (Sudeste X Nordeste X Mato Grosso X Mato Grosso do Sul) – COII.

Tabela 6. Cenário B: Rio Doce como barreira – COII.

Tabela 7. Cenário C: Mata Atlântica X Cerrado - COII.

Tabela 8. Análise descritiva da diversidade genética para COI.

Tabela 9. Análise descritiva da diversidade genética para COII.

Tabela 10. Distância par-a-par em COI.

Tabela 11. Distância par-a-par em COII.

Tabela 12. Valores de F_{st} para COI entre as populações.

Tabela 13. Valores de F_{st} para COII entre as populações.

Tabela 14. Testes de neutralidade para COI.

Tabela 15. Testes de neutralidade para COII.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com a localização dos espécimes sequenciados.

Figura 2. Teste de saturação para COI.

Figura 3. Teste de saturação para COII.

Figura 4. Rede de haplótipos para COI.

Figura 5. Rede de haplótipos para COII.

Figura 6. Distribuição *mismatch* do gene COI.

Figura 7. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Sudeste.

Figura 8. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Nordeste.

Figura 9. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Mato Grosso.

Figura 10. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Mato Grosso do Sul.

Figura 11. Distribuição *mismatch* do gene COII.

Figura 12. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Sudeste.

Figura 13. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Nordeste.

Figura 14. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Mato Grosso.

Figura 15. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Mato Grosso do Sul.

Figura 16. Árvore de máxima-verossimilhança das sequências concatenadas.

RESUMO

Terpides sooretamae Boldrini & Salles 2009 ocorre em diferentes biomas brasileiros, em cursos d'água com características ecológicas e físicas diversificadas, na Mata Atlântica e no Cerrado. A literatura aponta para uma série de casos em que espécies que ocorrem em regiões diferentes, situadas em biomas distintos, apresentam ampla variabilidade a nível molecular. Este trabalho focou em explorar a relação entre a estrutura populacional de *Te. sooretamae* e a sua capacidade de dispersão em um sistema geograficamente diverso, ecologicamente relevante e molecularmente não explorado: os padrões da estruturação genética de diferentes populações ao longo da distribuição da espécie. Para isso foi utilizado um total de 155 indivíduos; os mesmos foram submetidos à extração do DNA genômico (kit de extração da Promega®) e amplificação de duas regiões do mtDNA (COI e COII), purificação e sequenciamento. As sequências (57 de COI e 80 de COII) foram conferidas no BLAST (ferramenta de busca por similaridade), alinhadas e editadas. Foram conduzidas análises filogenéticas de máxima-verossimilhança, diversidade haplotípica, geração de redes de haplótipos, AMOVA, testes de neutralidade e distribuição *mismatch*. Os resultados evidenciaram uma relação próxima entre os indivíduos do Sudeste e do Nordeste, com baixas taxas de variabilidade entre as sequências obtidas, sendo possível afirmar que as populações do Sudeste e do Nordeste mantêm fluxo gênico bidirecional. Os valores de F_s de F_u e D de Tajima e os gráficos de distribuição *mismatch* sugerem que ambas populações estão em processo de expansão populacional recente. As populações de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul apresentaram divergência alta em relação às populações do Sudeste e do Nordeste, sendo que a população do Mato Grosso do Sul apresentou os valores mais altos quando comparada às demais populações. As populações de Mato Grosso do Sul, com alta divergência molecular em relação às demais populações e com uma posição distante destas na árvore de máxima-verossimilhança, podem se tratar de uma espécie distinta de *Te. sooretamae*.

Palavras-chave: dispersão, Mata Atlântica, fluxo gênico, diversidade críptica

ABSTRACT

Terpides sooretamae Boldrini & Salles 2009 occurs in various Brazilian biomes, at watercourses ecologically and physically diversified from Atlantic rainforest and Cerrado (Brazilian savannah). The bibliography exhibits many cases in which species that occur at different places, located at distinct biomes, show large variability at molecular level. The aim of this work was to investigate the populational structure of *Te. sooretamae* and its dispersion powerful in a geographically diverse, remarkable ecologically and unknown molecularly system: the genetic patterns of structuration of such populations at whole distributional range. For this purpose, it was utilized an amount of 155 individuals. For the DNA extraction, it was applied a Promega® protocol of DNA extraction; two regions of mtDNA were amplified (COI and COII), purified and sequenced. The sequences (57 of COI and 80 of COII) were conferred with BLAST (similarities search tool), after those was aligned and edited. Some analysis were conducted, such as phylogenetic analysis of maximum-likelihood, calculations of haplotypic diversity and generation of haplotype networks, AMOVA, neutrality tests and mismatch distributions. The results show a strong affinity between individuals from Southeast Brazil and Northeast Brazil, with low values of genetic variation between its sequences; based on this, we can say that the populations from Southeast Brazil and Northeast Brazil keep birectional gene flow. The Fu's F_s and Tajima's D values plus the mismatch distribution graphics suggest that both populations are through in a recent demographic expansion. The populations from Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, on the other hand, show high divergence compared to the Southeast and Northeast populations, where the ones from Mato Grosso do Sul show extremely high values. With high molecular variation compared to other populations and showing a peculiar position in the maximum-likelihood, the populations from Mato Grosso do Sul may constitute a distinct species.

Keywords: dispersion, Atlantic Forest, gene flow, cryptic diversity

INTRODUÇÃO

Leptophlebiidae Banks 1900 é a segunda família mais numerosa de Ephemeroptera, com 131 gêneros e mais de 600 espécies; somente na região Neotropical são 45 gêneros e aproximadamente 200 espécies descritas (Barber-James *et al.* 2008). A família apresenta distribuição global, contudo, nota-se um alto grau de endemismo na América do Sul (Domínguez *et al.* 2006).

Atualmente, há duas classificações vigentes para as relações internas em Leptophlebiidae. Uma delas foi proposta por Peters (1980), que consiste na divisão em uma subfamília denominada Atalophlebiinae, ocorrente no hemisfério sul e engloba todos os gêneros até então conhecidos para Leptophlebiidae, com exceção de oito gêneros remanescentes, alocados em Leptophlebiinae. Uma outra classificação foi recentemente proposta por Kluge (2009), onde o autor dividiu Atalophlebiinae em várias subfamílias, tendo Atalophlebomaxillata + Calliarcyinae como grupo-irmão de Terpidinae. Posteriormente, Godunko *et al.* (2015) corroboraram a classificação de Kluge através de análises envolvendo filogenia com base em dados morfológicos.

Atalophlebiinae reúne mais de 100 gêneros e 500 espécies (O'Donnel & Joackusch 2008), que estão divididas em linhagens filéticas distintas (Peters 1980; Domínguez *et al.* 2005). Peters (1980) considerou a possibilidade de classificar essas linhagens enquadrando-as como tribos, no entanto, a classificação a nível de tribo não é usual nos estudos envolvendo Ephemeroptera, e apesar do autor alegar que a mesma ajudaria na compreensão da evolução dos vários grupos que compõem a ordem, preferiu não fazê-la, mantendo em seu trabalho o termo “linhagens”, como são reconhecidas atualmente (Peters 1980).

Dentre estas, existe a linhagem Terpides que foi erigida por Savage (1986) englobando os gêneros *Terpides* Demoulin 1966 e *Fittkaulus* Savage & Peters 1978. Posteriormente,

Tikuna Savage, Flowers & Porras 2005 foi incluído nesta linhagem (Savage *et al.* 2005; Boldrini *et al.* 2009). Kluge (2009) analisou as relações filogenéticas em Atalophlebiinae e classificou a linhagem *Terpides* como uma subfamília, a qual foi chamada de Terpidinae, e os gêneros que compõem a linhagem (*Terpides*, *Fittkaulus* e *Tikuna*) tornaram-se subgêneros. Posteriormente, os subgêneros *Terpides*, *Fittkaulus* e *Tikuna* foram novamente reconhecidos como gêneros (Kluge 2015).

Os indivíduos da linhagem *Terpides* possuem características peculiares em relação aos demais representantes de Leptophlebiidae, como presença de fileiras de cerdas nos filamentos caudais e peças bucais hipognatas (Savage 1986). Apesar de constituir um grupo filogeneticamente bem resolvido em relação às demais linhagens de Atalophlebiinae, as relações internas entre os membros da linhagem *Terpides* ainda não foram incluídos em estudos filogenéticos.

Ao todo são reconhecidas 17 espécies para a linhagem: nove de *Terpides* – *Te. sooretamae* Boldrini & Salles *in* Boldrini *et al.* (2009), *Te. contamanensis* Kluge 2015, *Te. diadema* Lugo-Ortiz & McCafferty 1996, *Te. echinovarioris* Kluge 2015, *Te. guyanensis* Demoulin 1966, *Te. iguapoga* Molineri, Domínguez & Zúñiga *in* Zúñiga *et al.* (2015), *Te. jessiae* Peters & Harrison 1974, *Te. ornatodermis* Kluge 2015 e *Te. vinculum* (Traver 1947); quatro de *Fittkaulus* – *F. amazonicus* Kluge 2009, *F. cuiabae* Savage 1986, *F. cururuensis* Savage 1986 e *F. maculatus* Savage & Peters 1978; e quatro de *Tikuna* – *Ti. atramentum* (Traver 1947), *Ti. bilineata* (Needham & Murphy 1924), *Ti. fusconotum* Kluge 2009 e *Ti. nigrobulla* Kluge 2009.

A distribuição da linhagem *Terpides* é restrita à região Neotropical (Boldrini *et al.* 2009; Kluge 2015). No Brasil ocorrem três espécies de *Fittkaulus*: *F. cururuensis*, *F. cuiabae* e *F. maculatus*; uma de *Tikuna*: *Ti. bilineata* e duas de *Terpides*: *Te. guyanensis* e *Te.*

sooretamae espécie alvo deste trabalho (<www.ephemeroptera.com.br>, acesso em 03/02/2016).

Assim como os demais representantes de Ephemeroptera, *Te. sooretamae* possui ciclo de vida anfibiótico, ou seja, apresenta uma fase da vida aquática e uma fase alada (Domínguez *et al.* 2006). Os indivíduos juvenis dessa espécie, bem como os demais representantes da linhagem Terpides, ocorrem em ambientes lóticos, de correnteza fraca a moderada, são natantes, vivem próximos à vegetação marginal ou associados às raízes e ocupam habitats semelhantes aos daqueles onde vivem indivíduos de Baetidae Leach 1815 (Savage 1986). A espécie está registrada unicamente para o território brasileiro e possui distribuição ampla, com registros de ocorrência para os estados do Espírito Santo e Pernambuco, em regiões abrangidas pelo bioma Mata Atlântica, e no Mato Grosso, abrangido pelo Cerrado (Boldrini *et al.* 2009; Salles *et al.* 2010; Lima *et al.* 2012; Brasil *et al.* 2014; Angeli *et al.* 2015). Assim, *Te. sooretamae* apresenta distribuição disjunta, em localidades relativamente distantes e com barreiras biogeográficas importantes, como o Rio Doce (DaSilva & Pinto-da-Rocha 2011), com características físicas diversas e em ecossistemas distintos.

Devido ao seu ciclo de vida anfibiótico, os indivíduos dessa espécie apresentam formas de dispersão distintas em suas diferentes fases da vida: durante a fase juvenil a dispersão é restrita à bacia hidrográfica onde o indivíduo vive, deslocando-se através de nado e/ou *drift*, enquanto na fase alada o deslocamento seria através do voo, mas com um alcance limitado devido a sua relativa fragilidade e tempo de vida curto (Britain & Sartori 2003). Entretanto, estudos recentes indicaram que a vagilidade dos efemerópteros tem sido subestimada ao demonstrarem que os mesmos teriam a capacidade de dispersão transoceânica (Monaghan *et al.* 2005; Vuataz *et al.* 2013; Rutschmann *et al.* 2014). Em um desses trabalhos, Monaghan *et al.* (2005) encontraram altos níveis de similaridade genética entre linhagens de Baetidae de Madagascar com aquelas provenientes da porção continental da África e até mesmo do sul da

Ásia; eles concluíram, então, que essa proximidade genética entre linhagens provenientes de localidades distantes só seria possível graças a fluxos bidirecionais de migração (Monaghan *et al.* 2005).

Estudos realizados com o intuito de inferir a diversidade molecular em Ephemeroptera revelaram alto grau de divergência entre as populações amostradas; evidenciam, inclusive, alta diversidade críptica nesses organismos através de inferências realizadas com mais de um marcador, em especial o gene mitocondrial COI, como demonstrado em espécies abundantes de Baetidae na Europa (Williams *et al.* 2006; Lucentini *et al.* 2011; Sproul *et al.* 2014) e na África (Pereira-da-Conceicao *et al.* 2012).

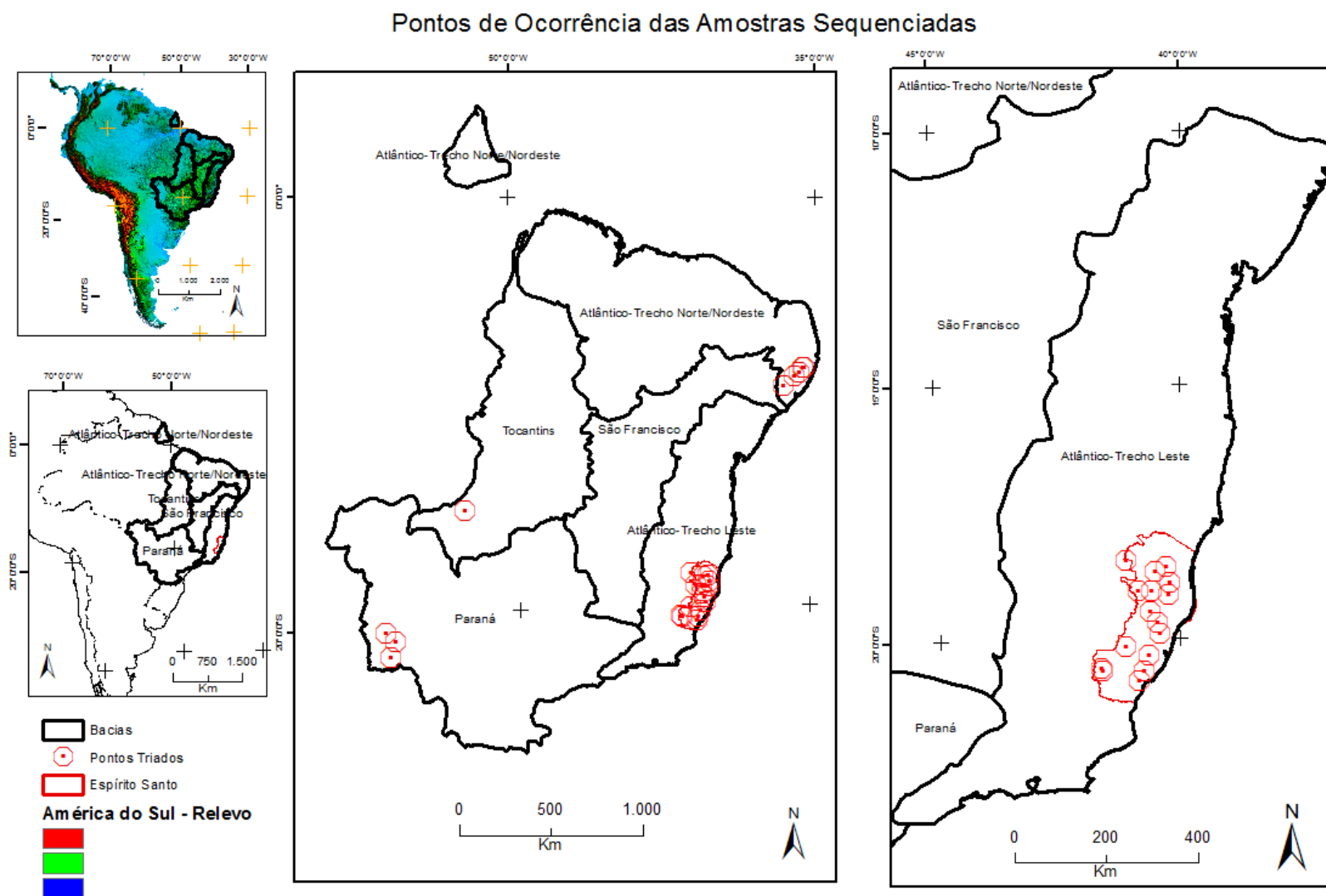
O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de dois marcadores específicos em *Te. sooretamae*, a fim de (i) relacioná-la com a sua distribuição geográfica, e assim obter os padrões de distribuição dos haplótipos ao longo da distribuição e inferir sobre os processos envolvidos na história evolutiva do táxon e (ii) detectar a existência de potenciais espécies crípticas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Um total de 155 indivíduos foi utilizado para as extrações de DNA, provenientes dos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Alagoas, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Figura 1). Foram realizadas campanhas nos seguintes locais: região sul do estado do Espírito Santo (municípios de Afonso Cláudio, Alfredo Chaves e Ibitirama), Pernambuco (municípios de Amaraji, Bonito e São Benedito do Sul), Alagoas (município de Quebrangulo), Bahia (municípios de Eunápolis, Guaratinga, Itagimirim, Itapebi e Teixeira de Freitas), Rio de Janeiro e Minas Gerais. Parte dos espécimes foram obtidos do acervo da Coleção Zoológica Norte Capixaba, da Universidade Federal do Espírito Santo (CZNC), que compreendem espécimes do Espírito Santo (municípios de Afonso Cláudio, Alfredo Chaves, Colatina, Domingos Martins, Ibiraçu, Ibitirama, Iconha, Jaguaré, João Neiva, Nova Venécia, Pancas, São Gabriel da Palha, São Mateus e Sooretama), Minas Gerais (município de Nova Belém), Mato Grosso (município de Nova Xavantina) e Mato Grosso do Sul (municípios de Bodoquena, Bonito, Caracol e Jardim). Por se tratar de uma espécie que vive a maior parte da vida em ambiente aquático, as populações foram definidas *a priori* a partir das bacias hidrográficas onde os indivíduos foram coletados, as quais foram organizadas em grupos a partir das regiões de ocorrência: Sudeste (estados do Espírito Santo e Minas Gerais), Nordeste (estados de Pernambuco e Alagoas), Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Tabela 1).

Figura 1. Mapa com a localização dos espécimes sequenciados. Representação do relevo da América do Sul (superior esquerdo) e grandes bacias (inferior esquerdo); locais de ocorrência dos espécimes sequenciados, representados por circunferências vermelhas (centro), com destaque para as localidades situadas no Sudeste (direita).



Sistema de Coordenadas Geográficas - Datum: SIRGAS 2000
Confeccionado por: Marx Engel Martins, Junho/2016
Fontes: Hidroweb ANA ; IJSN (2014) ; USGS EarthExplorer

Tabela 1. Modelo da divisão adotada no presente estudo para a separação dos grupos e populações de *T. sooretamae*, definidos *a priori*, para as análises moleculares subsequentes.

Grupos	Populações (Bacias)	Localidades
Sudeste	São Mateus	São Mateus (ES), Nova Venécia (ES), Nova Belém (MG)
	Doce	Jaguaré (ES), Sooretama (ES), Pancas (ES), Colatina (ES) e São Gabriel da Palha (ES)
	Jucu	Domingos Martins (ES)
	Piraquê-Açu	Ibiraçu (ES) e João Neiva (ES)
	Benevente	Afonso Cláudio (ES), Alfredo Chaves (ES) e Iconha (ES)
	Itapemirim	Ibitirama (ES)
Nordeste	Serinhaém	Amaraji (PE)
	Una	Bonito e São Benedito do Sul (PE)
	Mundaú	Quebrangulo (AL)
Mato Grosso	Araguaia	Nova Xavantina
Mato Grosso	Miranda	Bodoquena e Bonito
do Sul	Apa	Caracol

2. Da extração de DNA ao sequenciamento

Os espécimes utilizados foram preservados em álcool etílico absoluto 99,5° GL e estocados em freezer a -5° C. O DNA genômico foi extraído a partir das pernas, tórax, tórax e abdome, ou do corpo inteiro do animal. Foi utilizado o *kit* de extração *Wizard® SV Genomic DNA Purification System*, e seguido o protocolo anexo ao mesmo.

Foram amplificadas duas regiões do DNA mitocondrial: um fragmento contendo 400 pb da região Citocromo c Oxidase subunidade I (COI - parcial), utilizando-se os *primers* C1-J-1718 e universal HCO-2198 (Folmer et al. 1994; Simon et al. 1994); e um fragmento contendo 527 pb referente a região do Citocromo c Oxidase subunidade II (COII), com os *primers* TL2-J-3037 e C2-N-3661 (Takyia et al. 2006). Para cada 1µL de DNA genômico extraído, foram adicionados: 2,5µL de Invitrogen® Buffer MgCl₂ 10x; 2 µL de Invitrogen® MgCl₂ 50mM; 0,3 µL de cada primer; 1 µL de Promega® DNTp 100mM; 17,775 µL de água ultra-pura (ddH₂O); e 0,125 µL de Invitrogen® Platinum Taq DNA Polymerase. O volume final do mix de PCR foi de 25µL por amostra. Os fragmentos de COI foram amplificados de acordo com o perfil: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94° C por 45 segundos, 47°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e extensão final da fita a 72°C por 5 minutos. Os fragmentos de COII foram amplificados seguindo os seguintes parâmetros de temperatura: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e extensão final da fita a 72°C por 7 minutos.

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a fim de checar as condições dos mesmos; em todas as reações foi empregado o uso de um controle negativo para verificar uma possível contaminação. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com ExoSap 1:4, adicionando-se 1µL da solução já diluída para cada 10 µL de amostra; no termociclador, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 37°C por 30

minutos e 80°C por 15 minutos. As amostras purificadas foram sequenciadas pela MacroGen Inc. (Seoul, Coreia do Sul).

3. Análises

Ao todo, foram obtidas 57 sequências de COI e 80 sequências de COII. Foram feitas buscas por similaridade das sequências através do Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*, <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>), com o intuito de averiguar se a sequência obtida realmente era de Ephemeroptera. Com o auxílio do software Geneious 8.1 (Kearse *et al.*, 2012) cada sequência foi conferida e editada manualmente para detecção de picos duplos e *stop codons*, sendo posteriormente alinhadas pelo Clustal W como implementado no BioEdit (Hall 1999). Testes de saturação foram conduzidos pelo DAMBE (Xia *et al.* 2003; Xia & Lemey 2009), a fim de verificar a proporção entre transversões e transições.

O DNAsp 5.10 (Librado & Rozas 2009) foi utilizado para a obtenção de descritores da variabilidade genética e detecção dos haplótipos, delimitação dos grupos por região de procedência e cálculo da distribuição *mismatch*. A distância par-a-par foi obtida através do Mega 6 (Tamura *et al.* 2013). Redes de haplótipos foram criadas a partir de análises de *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999) com o uso do PopArt 1.7 (<http://popart.otago.ac.nz/>). Foram calculados o número de sítios segregantes e número médio de diferenças par a par, e testes como F_{st} , F_s de Fu e D de Tajima, conforme implementado no Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), o qual também foi utilizado para a obtenção de descritores da variabilidade genética.

Foram testados três cenários através da análise de variância molecular (AMOVA), conduzidas no Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005):

Cenário A: As populações estão divididas em quatro grupos: Sudeste (ES/MG) x Nordeste (PE/AL) x Mato Grosso x Mato Grosso do Sul;

Cenário B: As populações do leste estão separadas pelo Rio Doce e separadas das populações do oeste: Sul do Rio Doce x Norte do Rio Doce x Oeste;

Cenário C: As populações estão separadas de acordo com os biomas das quais se originaram: Mata Atlântica x Cerrado.

Foram conduzidas análises de máxima verossimilhança através da plataforma RAxML BlackBox no endereço eletrônico <http://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/> (Stamatakis *et al.*, 2008), usando o conjunto das sequências concatenadas (COI + COII, total 967 pb). O grupo externo foi formado por cinco sequências tomadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>), todas de indivíduos pertencentes a Ephemeroptera, excluindo Leptophlebiidae, com os respectivos *accession numbers*: *Ephemera danica*: COI - JX571926.1; COII - KF855909.1; *Siphuriscus chinensis*: HQ875717.1; *Isonychia ignota*: HM143892.1; *Caenis* sp.: GQ502451.1.

RESULTADOS

1. *Testes de saturação*

Segundo o teste de Xia et al. (2003), as sequências utilizadas para este estudo apresentaram taxas de transição maiores que as de transverso (Figs. 2 e 3), o que indica baixa saturação e a possibilidade de utilização das mesmas para estudos em filogenia e filogeografia.

2. *AMOVA (Análise de Variância Molecular)*

Os resultados para o teste de AMOVA em COI e COII (Tabelas 2-7) apresentaram uma variância maior entre os grupos do que entre as populações, com exceção do cenário A para COII (Tabela 5), onde a variação entre as populações dentro dos grupos foi o dobro da variação entre grupos. Os maiores valores de variância entre os grupos foi como apresentado no cenário C, na qual foram comparadas as populações de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul com as populações do Sudeste e do Nordeste (Tabelas 4 e 7).

Figura 2. Teste de saturação para COI. Os gráficos mostram as frequências de transições (s, em azul) e transversões (v, em verde) em relação à distância genética (eixo x).

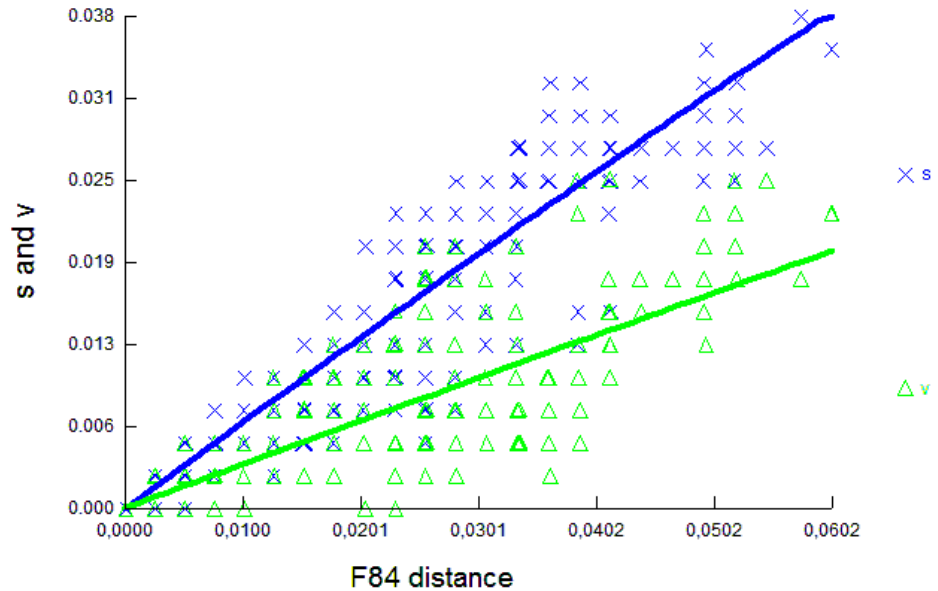
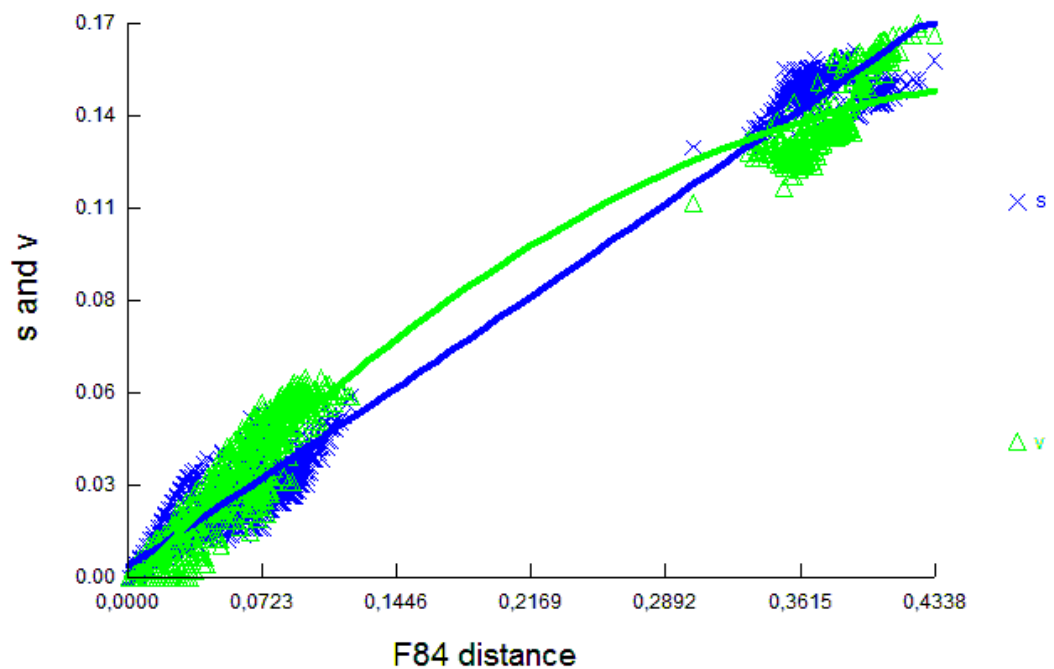


Figura 3. Teste de saturação para COII. Os gráficos mostram as frequências de transições (s, em azul) e transversões (v, em verde) em relação à distância genética (eixo x).



AMOVA – COI

Tabela 2. Cenário A: Regiões. Os grupos de populações foram Sudeste, Nordeste, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	3	60.565	2.15285 Va	64.54
Entre populações dentro dos grupos	7	5.323	-0.11254 Vb	-3.37
Dentro dos grupos	43	55.705	1.29546 Vc	38.84
Total	53	121.593	3.33576	

Tabela 3. Cenário B: Rio Doce como barreira. Os grupos de populações foram Norte do Rio Doce, Sul do Rio Doce e Oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	45,789	1,34962 Va	46,13
Entre populações dentro dos grupos	8	20,129	0,2805 VB	9,59
Dentro dos grupos	43	55,705	1,29546 Vc	44,28
Total	53	121.593	2,92558	

Tabela 4. Cenário C: Mata Atlântica X Cerrado.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	43,363	3,85752 Va	71,32
Entre populações dentro dos grupos	9	22,524	0,25540 VB	4,72
Dentro dos grupos	43	55,705	1,29546 Vc	23,95
Total	53	121.593	2,92558	

AMOVA - COII

Tabela 5. Cenário A: Grupos. Cenário A: Regiões. Os grupos de populações foram Sudeste, Nordeste, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	3	487,373	4,57362 Va	25,81
Entre populações dentro dos grupos	7	328,254	8,90628 VB	50,27
Dentro dos grupos	61	258,512	4,23790 Vc	23,92
Total	71	1074,139	2,92558	

Tabela 6. Cenário B: Rio Doce como barreira. Os grupos de populações foram Norte do Rio Doce, Sul do Rio Doce e Oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul).

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	480,917	8,79361 Va	43,99
Entre populações dentro dos grupos	8	334,710	6,95640 VB	34,80
Dentro dos grupos	61	258,512	4,23790 Vc	21,20
Total	71	1074,139	19,98790	

Tabela 7. Cenário C: Mata Atlântica X Cerrado.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	478,345	23,94280 Va	71,27
Entre populações dentro dos grupos	9	337,282	5,41210 VB	16,11
Dentro dos grupos	61	258,512	4,23790 Vc	12,62
Total	71	1074,139	33,59279	

3. Descritores da variabilidade genética e composição das sequências

Dos 155 indivíduos amostrados, foram amplificadas 57 sequências de COI (54 de *Terpides sooretamae*, uma de *Fittkaulus cururuensis* e duas de *Tikuna bilineata*) e 80 sequências de COII (74 de *Te. sooretamae*, duas de *F. maculatus*, uma de *F. cururuensis*, uma de *F. cf. amazonicus* e duas de *Ti. bilineata*). Os espécimes que tiveram ao menos uma das regiões de DNA mitocondrial amplificado estão relacionados no Apêndice I.

- COI

Das 54 sequências de *Te. sooretamae* foram obtidos 395 sítios informativos, dos quais 53 são sítios polimórficos (segregantes), acumulando 55 mutações, permitindo definir 28 haplótipos. A diversidade nucleotídica encontrada foi de 0,01162, e a diversidade haplotípica de 0,9085. O número médio de diferenças par-a-par foi de 4,5884. As frequências de bases nucleotídicas foram: C = 26,21%; T = 17,23%; A = 28,13%; G = 28,44%. Os descritores por população estão listados na tabela 8.

- COII

Das 74 sequências de *Te. sooretamae*, foram obtidos 467 sítios informativos, dos quais 157 são sítios polimórficos (segregantes), acumulando 183 mutações, permitindo definir 56 haplótipos. A diversidade nucleotídica encontrada foi de 0,06479. O número médio de diferenças par-a-par foi de 30,2574. As frequências de bases nucleotídicas foram: C = 33,83%; T = 30,19%; A = 19,36%; G = 16,61%. Os descritores por população estão listados na tabela 9.

Tabela 8. Análise descritiva da diversidade genética para COI.

Grupo	População	N	S	H	DH	DN
Sudeste	Benevente/ES	10	5	6	0,8444	0,00289
	Doce/ES	14	26	10	0,9231	0,01077
	Jucu/ES	2	2	2	1,0000	0,00501
	Itapemirim*/ES	2	----	1	0,0000	-----
	Piraquê-Açú/ES	2	3	2	1,0000	0,00750
	São Mateus (ES e MG)	6	5	5	0,9333	0,00419
Nordeste	Serinhaém*/PE	3	----	1	0,0000	----
	Una/PE	7	11	4	0,7143	0,00788
	Mundaú/AL	2	1	2	1,0000	0,00250
Mato Grosso	Araguaia/MT	3	7	3	1,0000	0,01167
Mato Grosso do Sul	Apa/MS	3	7	3	1,0000	0,01167

N = número de amostras; S = número de sítios segregantes; H = número de haplótipos; DH = diversidade haplotípica; DN = diversidade nucleotídica.

*Sequências não apresentaram polimorfismo.

Tabela 9. Análise descritiva da diversidade genética para COII.

Grupo	População	N	S	H	DH	DN
Sudeste	Benevente/ES	14	50	13	0,9890	0,03404
	Doce/ES	21	56	16	0,9286	0,03139
	Jucu/ES	2	3	2	1,0000	0,00569
	Piraquê-Açú/ES	2	37	2	1,0000	0,07021
	São Mateus (ES e MG)	8	54	8	1,0000	0,04445
	Serinhaém/PE	4	6	4	1,0000	0,00613
Nordeste	Uma/PE	8	52	8	1,0000	0,03985
	Mundaú/AL	2	3	2	1,0000	0,00574
Mato Grosso	AraguaiaMT	4	37	4	1,0000	0,03606
Mato Grosso do Sul	Apa/MS	3	39	3	1,0000	0,05310
	Miranda/MS	4	1	2	0,5000	0,00096

N = número de amostras; S = número de sítios segregantes; H = número de haplótipos; DH = diversidade haplotípica; DN = diversidade nucleotídica.

4. *Distância par-a-par* (p-distance)

Para COI (Tab. 10), os valores de distância par-a-par se mantiveram abaixo de 0,03 para a maioria das duplas de sequências comparadas, com exceção dos indivíduos de Apa (Mato Grosso do Sul), que apresentaram médias dos valores de distância entre 0,03 e 0,036 em comparação com indivíduos de outras populações, e dos indivíduos das populações do Araguaia e Doce, que apresentaram uma média de 0,03 de distância entre si.

Em COII (Tab. 11), os valores de distância par-a-par se mostraram em geral mais altos que os apresentados para COI, com a população do Araguaia apresentando valores acima de 0,03 para quase todas as outras populações. As populações do Mato Grosso do Sul obtiveram valores de distância bem mais altos em relação às demais populações, sempre acima de 0,2.

Tabela 10. Distância par-a-par de COI entre as médias das distâncias dos indivíduos por população; valores iguais ou acima de a 0,3 foram destacados.

		Sudeste					Nordeste			Mato Grosso	
		Benevente/ES	Doce/ES	Jucu/ES	Itapemirim/ES	Piraquê-Açu/ES	São Mateus (ES e MG)	Serinhaém/PE	Una/PE	Mundaú/AL	Araguaia/MT
Sudeste	Benevente/ES										
	Doce/ES	0,006									
	Jucu/ES	0,004	0,008								
	Itapemirim/ES	0,001	0,005	0,003							
	Piraquê-Açu/ES	0,005	0,009	0,006	0,004						
	São Mateus/ES	0,003	0,007	0,005	0,002	0,005					
Nordeste	Serinhaém/PE	0,004	0,008	0,005	0,003	0,006	0,005				
	Una/PE	0,007	0,011	0,009	0,006	0,010	0,008	0,004			
	Mundaú/AL	0,005	0,009	0,006	0,004	0,008	0,005	0,001	0,005		
Mato Grosso	Araguaia/MT	0,026	0,030	0,027	0,024	0,028	0,027	0,025	0,029	0,027	
Mato Grosso do Sul	Apa/MS	0,032	0,035	0,033	0,030	0,033	0,032	0,033	0,036	0,033	0,019

Tabela 11. Distância par-a-par de COII entre as médias das distâncias dos indivíduos por população; valores iguais ou acima de 0,3 foram destacados.
MT = Mato Grosso; MS = Mato Grosso do Sul.

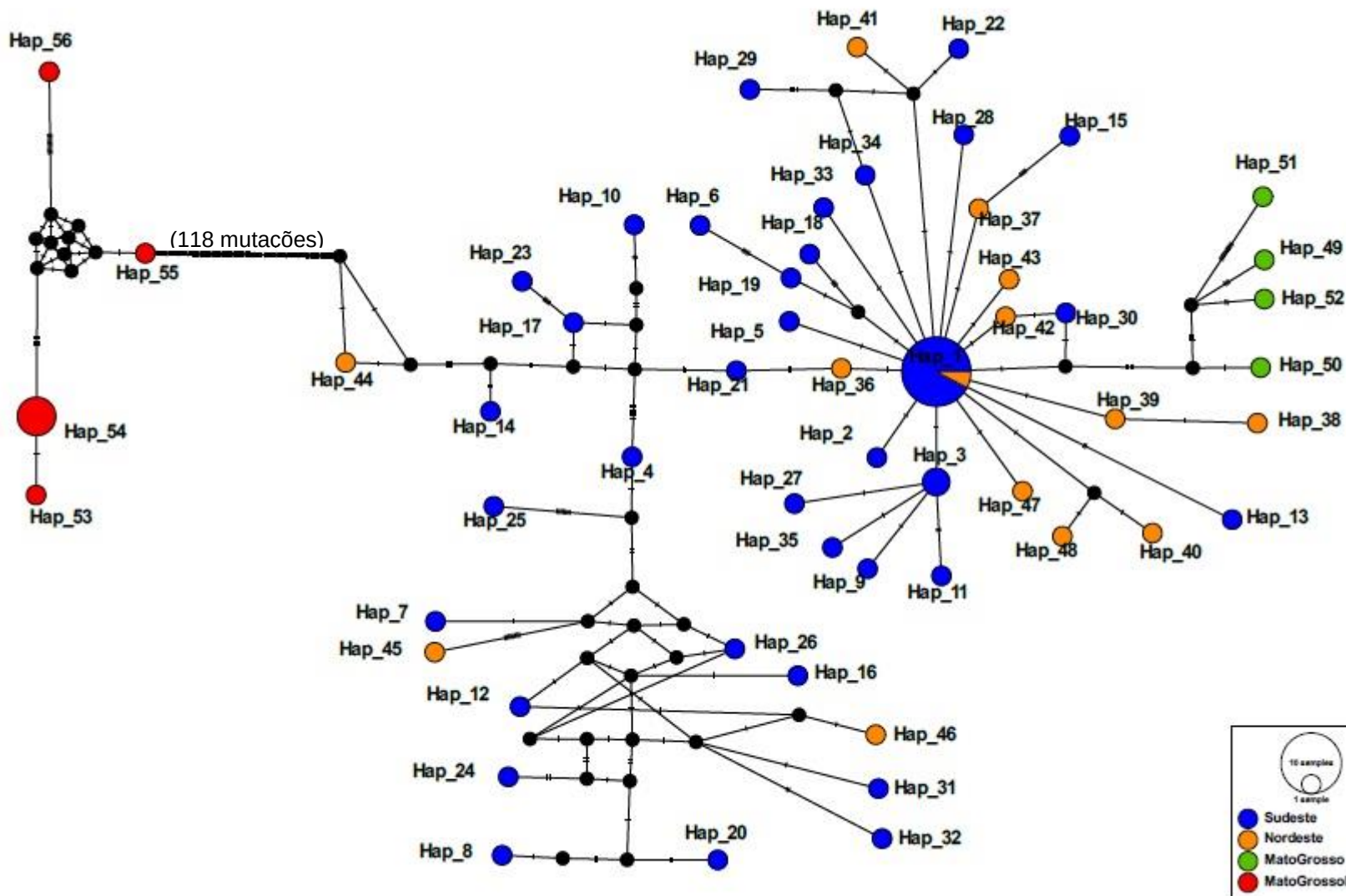
		Sudeste					Nordeste			Mato Grosso	Mato G. do Sul
		Benevente/ES	Doce/ES	Jucu/ES	Piraquê-Açu/ES	São Mateus (ES e MG)	Serinhaém/PE	Una/PE	Mundaú/PE	Araguaia/MT	Miranda/MS
Sudeste	Benevente/ES										
	Doce/ES	0,017									
	Jucu/ES	0,012	0,014								
	Piraquê-Açu/ES	0,022	0,023	0,025							
	São Mateus (ES e MG)	0,020	0,022	0,019	0,024						
Nordeste	Serinhaém/PE	0,011	0,014	0,006	0,023	0,019					
	Una/PE	0,018	0,020	0,015	0,025	0,023	0,015				
	Mundaú/AL	0,012	0,015	0,006	0,025	0,020	0,006	0,015			
Mato Grosso	Araguaia/MT	0,032	0,035	0,029	0,041	0,037	0,028	0,035	0,029		
Mato Grosso do Sul	Miranda/MS	0,269	0,269	0,267	0,275	0,272	0,264	0,269	0,264	0,266	
	Apa/MS	0,273	0,274	0,274	0,276	0,276	0,272	0,273	0,272	0,274	0,018

5. *Redes de haplótipos*

Em relação ao marcador COI, o haplótipo 3 foi o mais abundante, compartilhado por 14 indivíduos provenientes de Alfredo Chaves, Colatina, Domingos Martins, Ibitirama, Nova Venécia, São Gabriel da Palha e São Mateus (ES), seguido do haplótipo 18 com oito indivíduos procedentes de Amaraji e Bonito (PE) e Quebrangulo (AL) (Apêndice II). Outros haplótipos foram menos frequentes: o haplótipo 4 foi encontrado em cinco indivíduos procedentes de Afonso Cláudio, Ibirapu, Iconha e São Gabriel da Palha (ES) e Nova Belém (MG); o haplótipo 5, compartilhado por dois indivíduos, procedentes de Colatina e Iconha (ES); e haplótipo 16, compartilhado por dois indivíduos de Sooretama (ES). Os demais haplótipos ocorreram em apenas um indivíduo cada (Apêndice II). A rede de haplótipos de COI (Figura 4) apresenta os dois haplótipos mais recorrentes, representados como H3 e H18, localizados respectivamente no Sudeste e no Nordeste, separados por uma mutação. Os haplótipos do Sudeste encontram-se separados por no mínimo 6 mutações daqueles do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul; estas últimas regiões não apresentam compartilhamento de haplótipos, nem com populações de outras localidades.

Para COII, o haplótipo 1 foi o mais frequente, sendo compartilhado por 13 indivíduos procedentes de Alfredo Chaves, Colatina, Domingos Martins, Jaguaré, São Gabriel da Palha e Sooretama (ES) e Bonito (PE), seguido pelo haplótipo 54, compartilhado por quatro indivíduos procedentes de Bodoquena, Bonito e Caracol (MS), e pelo haplótipo 3, compartilhado por dois indivíduos, provenientes de Alfredo Chaves e Sooretama (ES) (Apêndice II). Os demais haplótipos estavam presentes em um indivíduo cada. A rede de haplótipos gerada para COII (Figura 5) não apresenta estruturação clara entre os indivíduos do Sudeste e do Nordeste, tendo, inclusive, um dos haplótipos (Hap_1, o mais abundante) compartilhado pelos dois grupos (Apêndice II). Entretanto, a distância é maior entre estes e os de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul; o número de mutações é elevado entre os indivíduos de Mato Grosso do Sul e os demais, totalizando 118 mutações (Figura 5).

Figura 5. Rede de haplótipos para COII. Cada traço perpendicular às linhas representa uma mutação. O tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de haplótipos, enquanto as regiões estão representadas por cores (vide legenda).



6. *Fluxo gênico, testes de neutralidade e distribuição mismatch*

Em COI, (Tabela 14) os dados de fluxo gênico (F_{st}) observados entre populações do Sudeste e do Nordeste estão abaixo ou próximos de 0,25, exceto entre Benevente/ES e bacias do grupo Nordeste, cujos valores variaram de 0,38308 a 0,5353; e entre Mundaú/AL e Itapemirim/ES (0,6667). Entre as bacias de Mato Grosso + Mato Grosso do Sul e as demais, houve valores muito elevados, sempre acima de 0,6. Em COII (Tabela 15) os valores de F_{st} apresentaram-se abaixo de 0,25 entre as bacias de Sudeste e Nordeste, enquanto o grupo Mato Grosso do Sul mostrou valores elevados (acima de 0,9) em comparação àqueles dois grupos.

Os testes D de Tajima, realizados para COI, resultaram em índices significativos ($p < 0,05$) para os grupos Sudeste e Nordeste; os valores de F_s de F_u foram significativos apenas para o Sudeste (Tabela 14). Em COII, o D de Tajima mostrou-se significativamente negativo ($p\text{-valor} < 0,05$) para Nordeste e Mato Grosso, e o F_s de F_u se manteve significativamente negativo para Sudeste e Nordeste (Tabela 15).

Tabela 12. Valores de Fst para COI entre as populações, onde valores iguais ou acima de 0,7 foram destacados, indicando ausência de fluxo gênico entre as populações relacionadas.

	Sudeste				Nordeste				Mato Grosso		Mato G. do Sul
	Benevente/ES	Doce/ES	São Mateus (ES e MG)	Piraquê- Açu/ES	Jucu/ES	Itapemirim/ES	Serinhaém/PE	Una/PE	Mundaú/AL	Araguaia/MT	Apa/MS
Benevente/ES	0,00000										
Doce/ES	-0,02140	0,00000									
São Mateus (ES e MG)	-0,01600	-0,03916	0,00000								
Piraquê-Açu/ES	0,18994	-0,11297	0,04673	0,00000							
Jucu/ES	0,19207	-0,15464	0,03627	0,00000	0,00000						
Itapemirim/ES	-0,27976	-0,29897	-0,30435	0,00000	0,00000	0,00000					
Serinhaém/PE	0,53530	0,11888	0,41406	0,57143	0,64706	1,00000	0,00000				
Una/PE	0,38308	0,19287	0,28802	0,26343	0,23178	0,14547	-0,16667	0,00000			
Mundaú/AL	0,51807	0,08005	0,31148	0,33333	0,40000	0,66667	0,25000	-0,17128	0,00000		
Araguaia/MT	0,82763	0,63445	0,75117	0,63487	0,65068	0,68657	0,76667	0,70371	0,67820	0,00000	
Apa/MS	0,87339	0,70093	0,81250	0,72269	0,74576	0,78182	0,84615	0,77895	0,77500	0,43478	0,00000

Tabela 13. Valores de Fst para COII entre as populações, onde valores iguais ou acima de 0,7 foram destacados, indicando ausência de fluxo gênico entre as populações relacionadas.

	Sudeste					Nordeste			M. Grosso	Mato G. do Sul	
	Benevente/ES	Doce/ES	Piraquê-Açu/ES	Jucu/ES	São Mateus (ES e MG)	Serinhaém/PE	Una/PE	Mundaú/AL	Araguaia/MT	Miranda/MS	Apa/MS
Benevente/ES	0,00000										
Doce/ES	-0,01957	0,00000									
Piraquê-Açu/ES	0,07903	0,00153	0,00000								
Jucu/ES	-0,06191	-0,09109	0,17391	0,00000							
São Mateus (ES e MG)	0,00653	-0,02810	-0,17980	-0,05240	0,00000						
Serinhaém/PE	0,04298	0,03107	0,40496	0,11111	0,09749	0,00000					
Una/PE	-0,03719	-0,03156	-0,05092	-0,13858	-0,03510	0,00118	0,00000				
Mundaú/AL	-0,03866	-0,05367	0,17391	0,00000	-0,01615	0,11111	-0,15589	0,00000			
Araguaia/MT	0,47426	0,42198	0,38462	0,41722	0,34619	0,53651	0,36955	0,41722	0,00000		
Miranda/MS	0,95403	0,93788	0,96556	0,99095	0,93245	0,98920	0,94131	0,99087	0,95775	0,00000	
Apa/MS	0,93815	0,92610	0,89290	0,92662	0,90436	0,94966	0,91420	0,92604	0,91345	0,32706	0,00000

Tabela 14. Testes de neutralidade para COI, com os valores significativos destacados em negrito (p-valor < 0,05).

Grupos	N	D-Tajima (P-valor)	Fs de Fu (P-valor)
Sudeste	36	-2,45631 (0,000)	-10,29317 (0,000)
Nordeste	12	-2,06659 (0,002)	-0,42572 (0,346)
Mato Grosso	3	0,00000 (0,786)	0,30830 (0,367)
Mato Grosso do Sul	3	0,00000 (0,760)	0,13353 (0,261)

Tabela 15. Testes de neutralidade para COII, com os valores significativos destacados em negrito (p-valor < 0,05).

Grupos	N	D-Tajima (P-valor)	Fs de Fu (P-valor)
Sudeste	47	-1,05327 (0,131)	-19,17848 (0,000)
Nordeste	14	-1,46586 (0,069)	-8,28586 (0,002)
Mato Grosso	4	-0,85430 (0,076)	0,33408 (0,345)
Mato Grosso do Sul	7	-0,64848 (0,304)	2,46232 (0,868)

A distribuição *mismatch* do gene COI para o total das amostras resultou em uma curva bimodal (Figura 6), enquanto se apresentou unimodal para as populações do Sudeste e do Nordeste (Figuras 7-8). O número de diferenças mais recorrente esteve entre zero e cinco para o Sudeste, chegando a um número máximo de diferenças nucleotídicas entre 10 e 15 (Figura 7); no Nordeste, o valor mais frequente ficou também entre zero e cinco, com um número máximo de diferenças igual a 10 (Figura 8). Em COII, a distribuição *mismatch* resultou em uma curva multimodal (Figura 11); o mesmo padrão foi observado para as populações do Sudeste e do Nordeste (Figuras 12-13). O número de diferenças mais recorrente nas populações do Sudeste esteve entre zero e cinco, com um valor máximo em torno de 35 (Figura 12); para o Nordeste, o número mais recorrente foi entre zero e cinco, e o máximo de diferenças observado chegou próximo de 40 (Figura 13). As distribuições para Mato e Mato Grosso do Sul não apresentaram curvas bem definidas, provavelmente devido ao baixo número de amostras obtido (Figuras 9-10; 14-15).

Figura 6. Distribuição *mismatch* do gene COI. O eixo das abscissas representa a quantidade de diferenças na composição nucleotídica entre as sequências analisadas, enquanto o eixo das ordenadas apresenta a frequência com que as mesmas ocorrem na amostra. O gráfico em linha cheia representa os valores esperados, enquanto a linha pontilhada representa os valores observados.

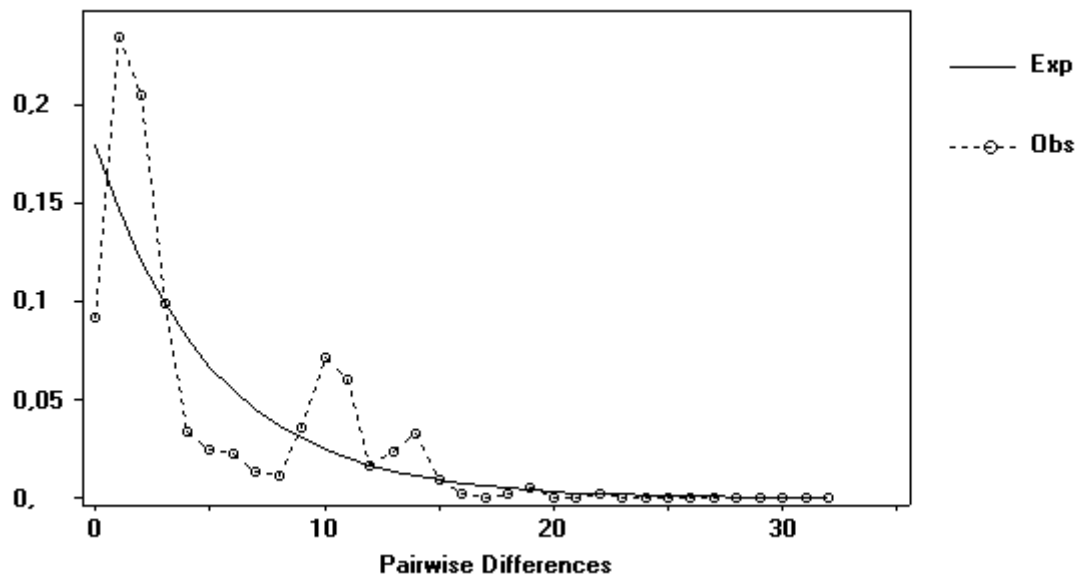


Figura 7. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Sudeste.

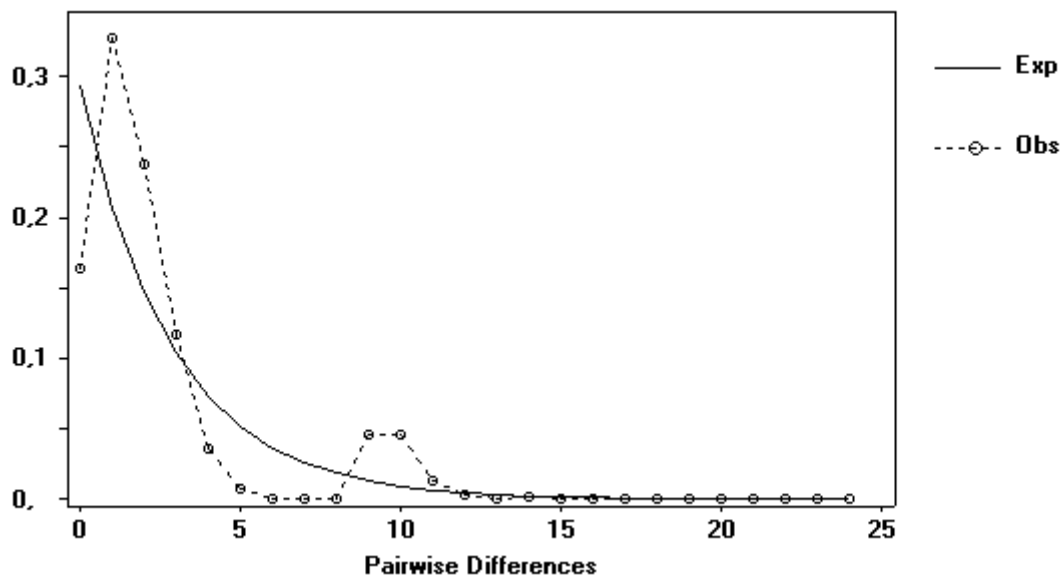


Figura 8. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Nordeste.

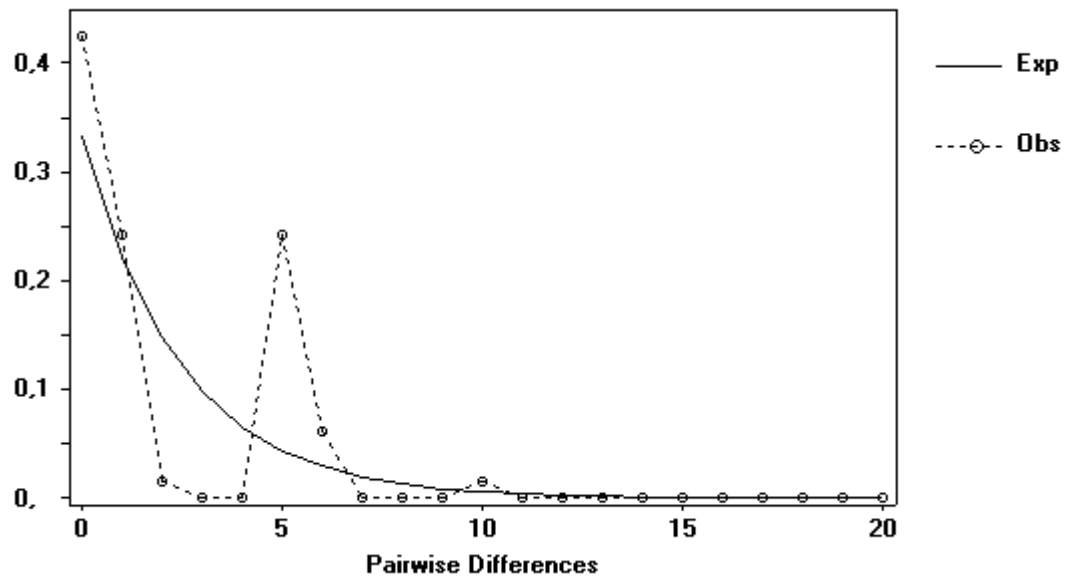


Figura 9. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Mato Grosso.

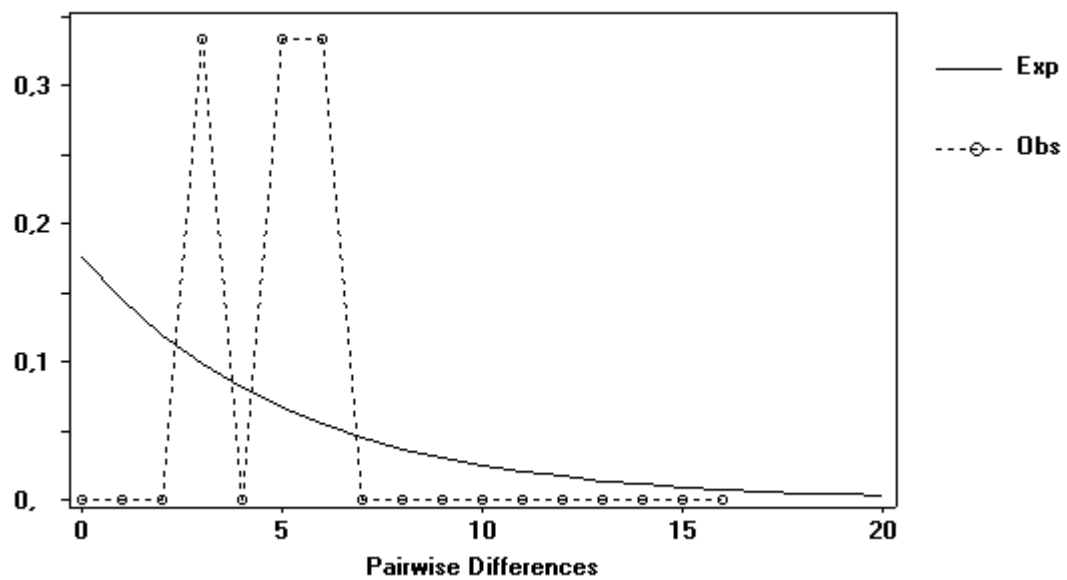


Figura 10. Distribuição *mismatch* do gene COI para as populações do Mato Grosso do Sul.

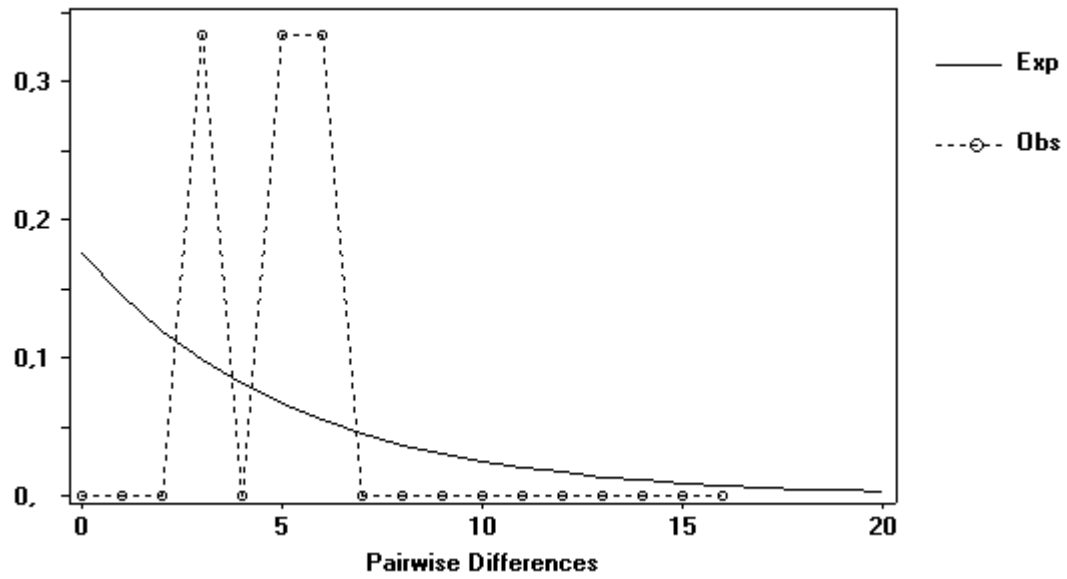


Figura 11. Distribuição *mismatch* do gene COII.

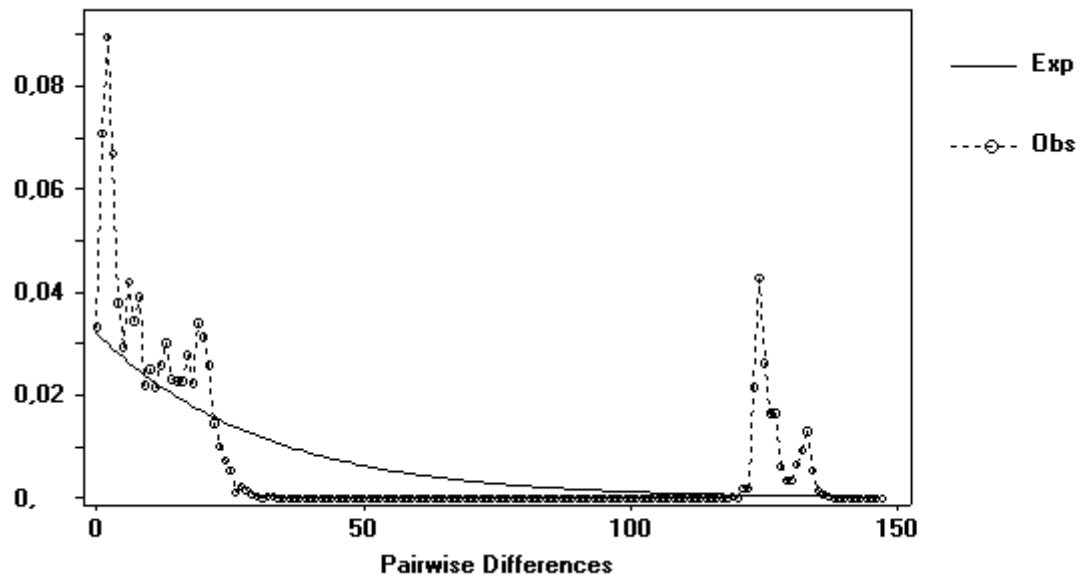


Figura 12. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Sudeste.

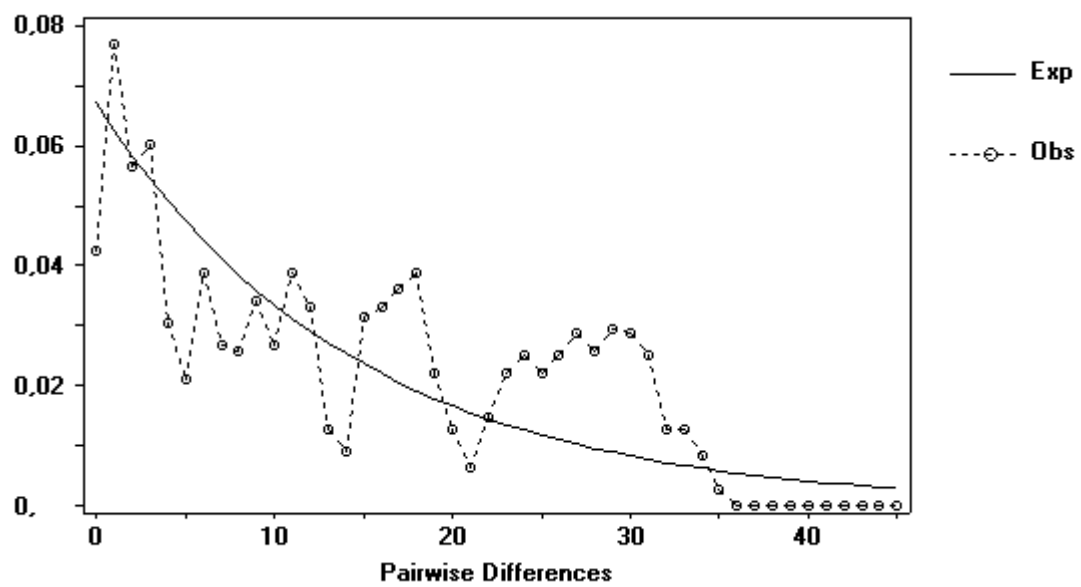


Figura 13. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Nordeste.

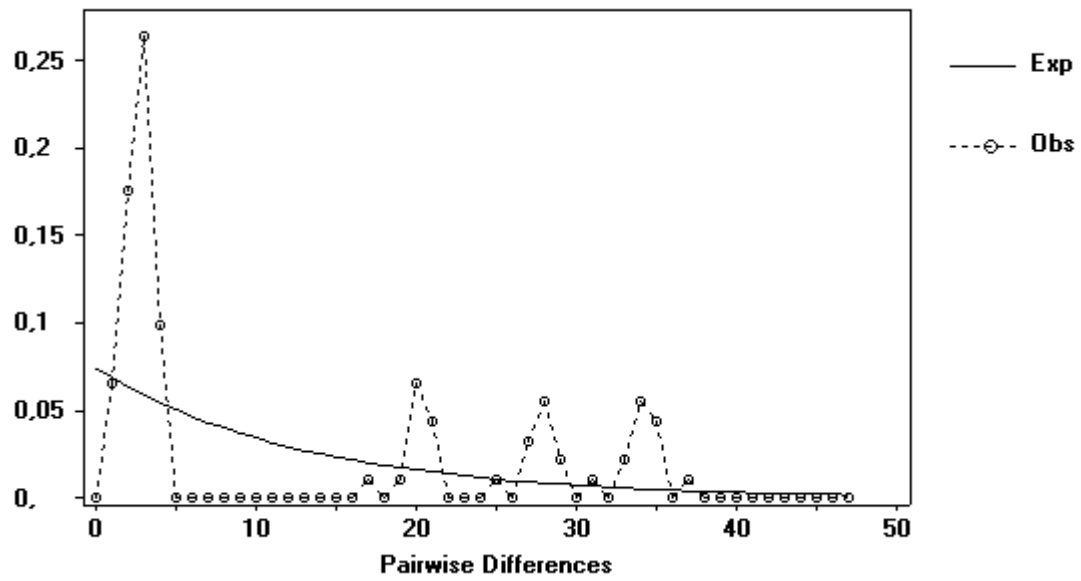


Figura 14. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Mato Grosso.

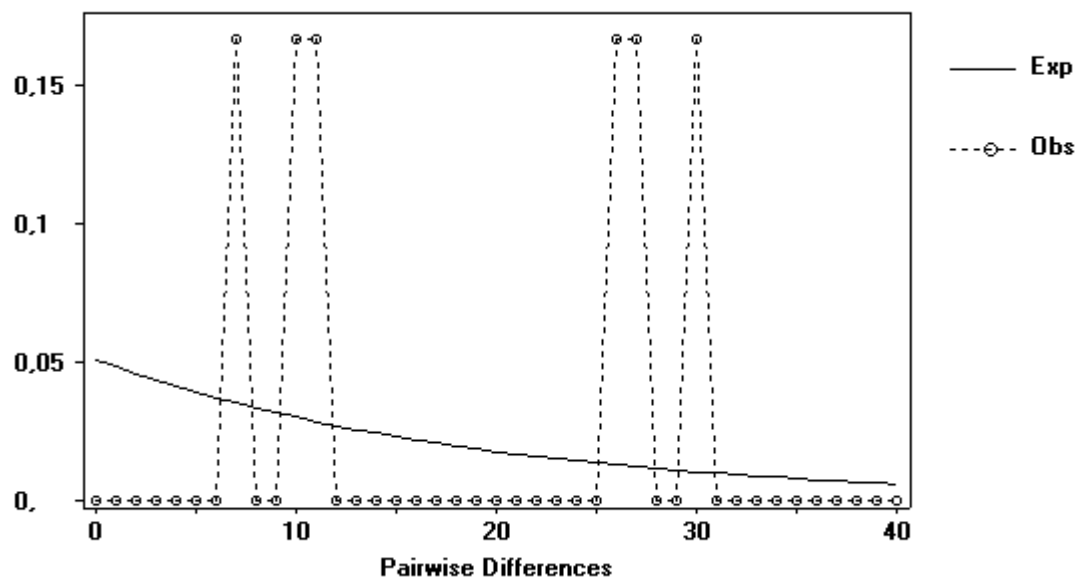
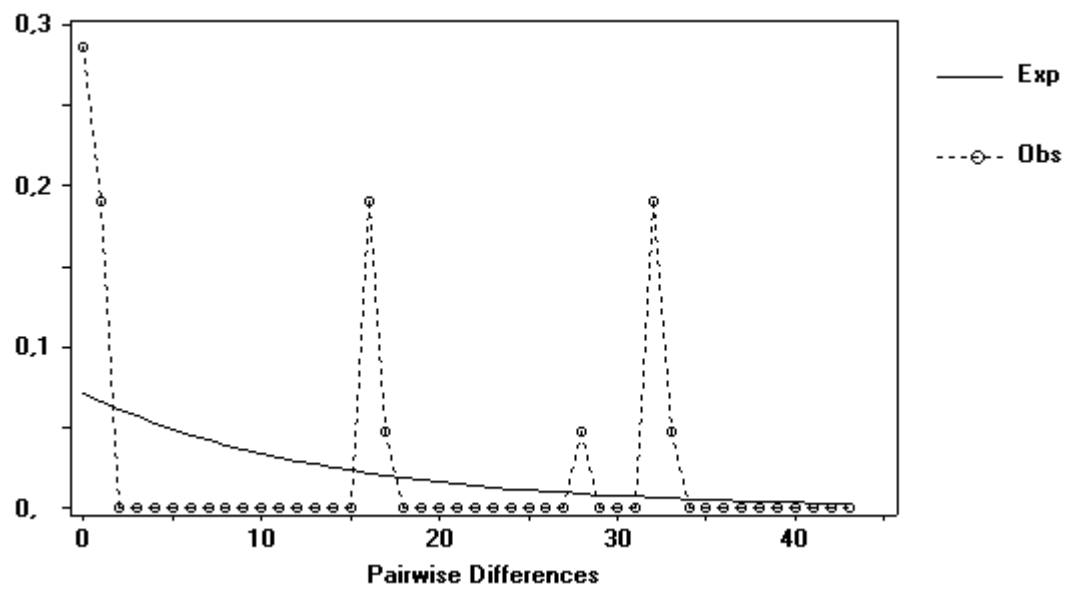


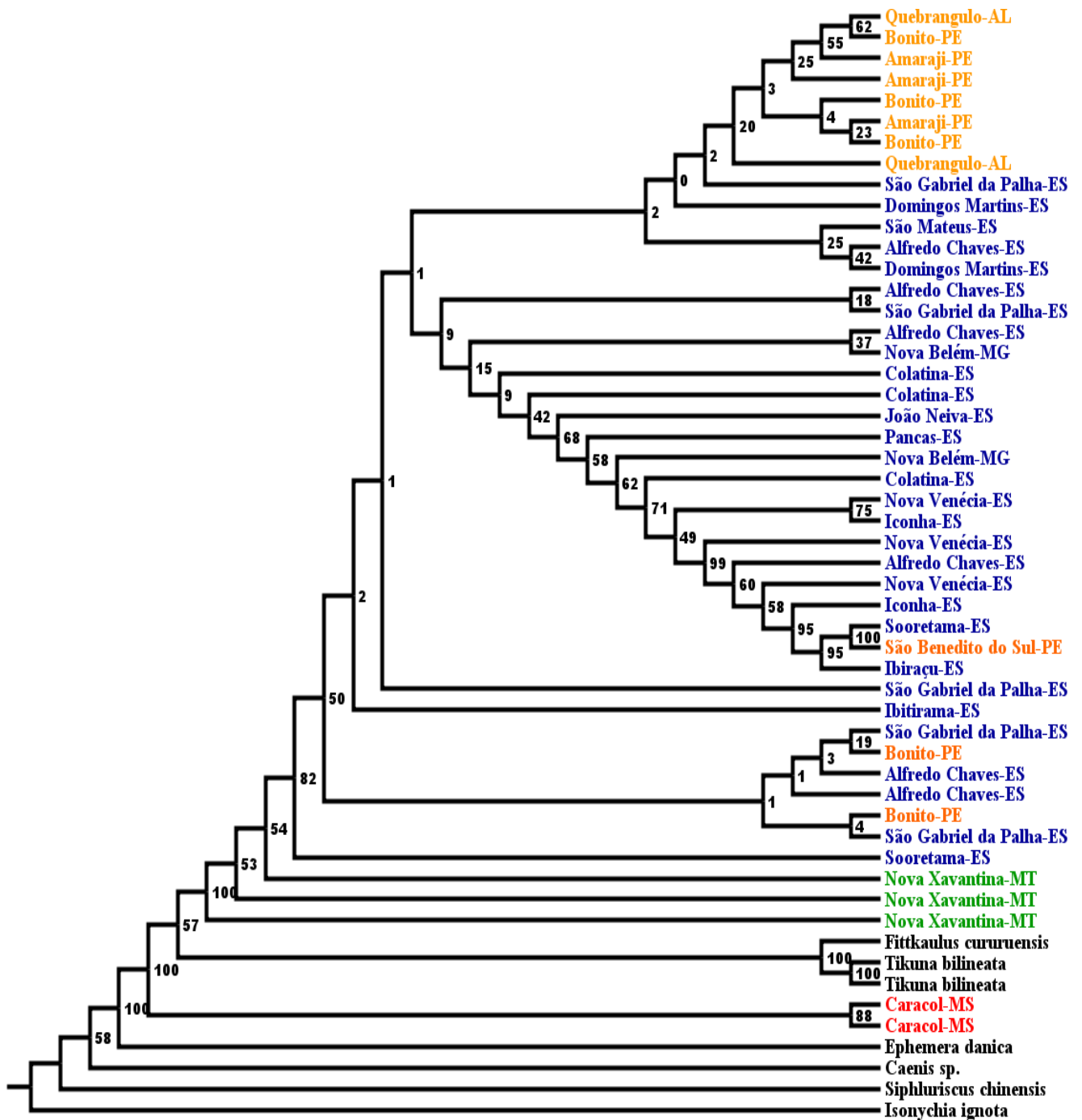
Figura 15. Distribuição *mismatch* do gene COII para as populações do Mato Grosso do Sul.



7. Inferências filogenéticas

A árvore resultante da análise de máxima-verossimilhança de sequências concatenadas (Figura 16) resultou num clado formado somente por *Te. sooretamae*, com indivíduos do Sudeste, Nordeste e Mato Grosso, com um valor de *bootstrap* igual a 82. Dos indivíduos do Nordeste, a maior parte ficou reunida em um clado (*bootstrap* = 20), enquanto outros três indivíduos apareceram distribuídos em ramos nos quais formavam grupo-irmão com algum indivíduo do Sudeste. Os representantes de Mato Grosso se mostraram um grupo parafilético, no qual um dos indivíduos apareceu como irmão de (Sudeste + Nordeste), com *bootstrap* igual a 54, e os demais como irmãos destes. Todavia, os indivíduos de Mato Grosso do Sul permaneceram fora desse clado, formando grupo irmão com ((*F. cururuensis* + *Ti. bilineata*) + *Te. sooretamae*), com valor de *bootstrap* igual a 100.

Figura 16. Árvore de máxima-verossimilhança das sequências concatenadas. Os indivíduos de *Te. sooretamae* aparecem com o nome escrito em cores (azul = Sudeste; alaranjado = Nordeste; verde = Mato Grosso; vermelho = Mato Grosso do Sul), enquanto os pertencentes a outras espécies estão escritos de preto. Os valores de *bootstrap* estão localizados nos nós de cada ramo.



DISCUSSÃO

1. Fluxo gênico e a dinâmica das populações

Entre as populações do Sudeste não houve estruturação, dados os baixos valores de F_{st} entre as mesmas (Tabelas 12-13) e o compartilhamento de haplótipos em COII (Figura 5; Apêndice II). O Rio Doce, no Sudeste, comportou-se como uma importante barreira biogeográfica para artrópodes em outros estudos, os quais envolveram lepidópteros (Brown 2005), himenópteros (Mariano *et al.* 2008) e opiliões (DaSilva e Pinto-da-Rocha 2011). No presente trabalho, contudo, não houve evidências de estruturação entre as populações que se encontram ao norte e ao sul do Rio Doce. Entretanto, essa hipótese não foi testada explicitamente neste estudo.

As populações do Sudeste e do Nordeste mostraram-se fortemente relacionadas entre si, como evidenciado na rede de haplótipos (Figuras 4-5), valores de F_{st} (Tabelas 12-13) e árvore de máxima-verossimilhança (Figura 16), constatando-se que há fluxo gênico bidirecional entre elas. A grande maioria dos haplótipos do Sudeste difere daqueles provenientes do Nordeste em, no máximo, uma ou duas mutações (Figuras 4-5). Ambos estão localizados em áreas de Mata Atlântica e encontram-se em ambientes que apresentam características físicas semelhantes, como umidade, temperatura e altitude. Essa correlação entre as duas regiões amostradas já foi observada em outros organismos dulciaquícolas, o que sugere uma conexão geologicamente recente entre as bacias hidrográficas do leste brasileiro (Buckup 2011). Assim, torna-se evidente a importância da manutenção dos biomas como condição essencial para a manutenção do fluxo gênico entre os organismos (Dixo *et al.* 2009; Banhos *et al.* 2016).

Os valores obtidos dos testes estatísticos de D de Tajima e F_s de Fu (Tabelas 14-15) evidenciaram que as populações do Sudeste e do Nordeste estão passando por um processo de expansão populacional recente. Esses resultados, aliados ao fluxo gênico que foi constatado

entre as populações das duas regiões citadas, não condizem com a Hipótese dos Refúgios Florestais (Haffer 1969). Essa hipótese foi pensada para explicar a diversidade encontrada na Floresta Amazônica, sendo mais tarde aplicada à Mata Atlântica, como nos trabalhos de Carnaval & Moritz (2008) e Carnaval *et al.* (2009), e diz que as flutuações climáticas do Quaternário provocaram expansões e regressões da área florestal, com regiões isoladas de mata quando nos períodos de diminuição de cobertura vegetal. Assim, esses refúgios formados pelo isolamento dos fragmentos florestais propiciaram especiações e consequente aumento da biodiversidade por redução de fluxo gênico entre as populações que ficaram separadas em refúgios distintos (Carnaval & Moritz 2008; Carnaval *et al.* 2009).

Entretanto, recentemente Leite *et al.* (2016) sugeriram uma hipótese alternativa para explicar a diversidade encontrada na Mata Atlântica: em um estudo envolvendo cinco espécies de mamíferos, os autores encontraram padrões de expansão populacional semelhantes entre as espécies analisadas, e concluíram que a cobertura vegetal da Mata Atlântica durante o Último Máximo Glacial se estendeu para além da plataforma continental, em áreas atualmente submersas pelo Oceano Atlântico. A hipótese recebeu o nome de “Mata Atlântida” (Leite *et al.* 2016).

Em outro estudo recente, Thomaz *et al.* (2015) conduziram uma investigação acerca da diversidade genética de *Hollandichthys multifasciatus*, uma espécie de peixe ocorrente em rios costeiros da Mata Atlântica. As diferentes populações apresentaram similaridades no DNA mitocondrial, mesmo encontrando-se distribuídas em bacias distintas, que formam sistemas fechados em si. A explicação, assim como em Leite *et al.* (2016), se embasou nos períodos de regressão marinha do Último Máximo Glacial, mas com uma diferença: nesses períodos de abaixamento do nível do mar, os rios costeiros da Mata Atlântica tinham extensões maiores até chegar aos estuários, na época mais distantes por causa do afastamento da região costeira; essas antigas extensões dos rios, que hoje estão em áreas submersas, são

chamadas de paleodrenagens (Thomaz *et al.* 2015). De acordo com a modelagem conduzida pelos mesmos, os autores concluíram que as paleodrenagens se comunicavam, promovendo fluxo gênico entre bacias que hoje estão isoladas, o que explicaria a relativa baixa diversidade genética dos peixes dessa espécie. Esse modelo, portanto, pode ser adequadamente aplicado a outros organismos aquáticos de ambientes lóticos, como é o caso de *Te. sooretamae*.

Enquanto as análises conduzidas com o COI apresentaram Sudeste e Nordeste proximamente relacionados, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul parecem estar mais isolados. As mesmas análises com COII, no entanto, aproximam ainda mais as populações do Sudeste e Nordeste, enquanto deixam mais isoladas as populações de Mato Grosso e mais ainda as de Mato Grosso do Sul (Figuras 4-5). Considerando que as sequências de COII (número médio de diferenças par-a-par = 30,2574) apresentam maior variabilidade que as de COI (número médio de diferenças par-a-par = 4,5884), é possível sugerir que esse último é mais conservado e, portanto, remete a um passado mais remoto na história das genealogias das populações de *Te. sooretamae*. Os resultados dos testes de neutralidade (Tabelas 14-15) e da distribuição *mismatch* (Figuras 2-7) com os dois marcadores sugerem que as populações dessa espécie no Sudeste e no Nordeste estão passando por uma recente expansão, enquanto a disposição dos haplótipos em rede sugere que não há estruturação genética entre as populações dessas duas regiões. As populações de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, por outro lado, não apresentam fluxo gênico com Sudeste e Nordeste, e a tendência é que se tornem grupos cada vez mais isolados em relação aos demais.

A segregação observada nos indivíduos de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul pode ser explicada pelo fato de se encontrarem num ecossistema distinto, onde a diferença de paisagens em relação àquela onde se encontram as populações do Sudeste e do Nordeste agiria como uma barreira que impedisse o fluxo gênico. Pereira-da-Conceicao *et al.* (2012) observaram alta diversidade críptica em populações de *Baetis harrisoni* Barnard 1932

(Baetidae) na África do Sul, associando essa alta variação molecular à diversidade dos ambientes onde os indivíduos foram coletados. Os indivíduos de *Te. sooretamae* de Mato Grosso ocorrem em ambientes do Cerrado, próximos à área de transição com a Amazônia, enquanto os de Mato Grosso do Sul ocorrem em regiões próximas à Serra da Bodoquena, no Centro-Oeste brasileiro, em altitudes bem mais elevadas do que aquelas observadas para os indivíduos do Sudeste e Nordeste, que se encontram em regiões costeiras de Mata Atlântica. Portanto, a presença das populações dessa espécie em biomas diferentes pode estar interferindo diretamente no fluxo dos indivíduos entre as diversas regiões onde eles estão distribuídos, e refletindo, consequentemente, nas taxas de fluxo gênico baixas entre essas populações.

2. Dispersão

Por algum tempo, autores sugeriram que os insetos da ordem Ephemeroptera teriam baixa vagilidade, limitando sua área de vida ao corpo d'água, quando juvenis, e na fase alada os mesmos se restringiriam à vegetação próxima ao local da emergência (Brittain & Sartori, 2003). Contudo, estudos recentes mostraram que a capacidade de dispersão dos efemerópteros tem sido subestimada, através de trabalhos com filogenia molecular que evidenciaram relações muito próximas entre grupos que ocorriam tanto no continente como em ilhas relativamente distantes (Monaghan *et al.* 2005; Vuataz *et al.* 2013; Rutschmann *et al.*, 2014).

Entre o ponto de coleta mais ao norte do Espírito Santo e aquele no território do estado do Alagoas há uma distância de aproximadamente 1100 quilômetros. O valor de *Fst* manteve-se significativamente baixo entre as amostras das duas regiões, indicando fluxo gênico entre as populações; entretanto, o mesmo não foi observado entre as populações de Mato Grosso + Mato Grosso do Sul e as demais, apesar de serem igualmente distantes geograficamente. Isso pode ser explicado de duas maneiras: uma alta capacidade de dispersão nos indivíduos *Te.*

sooretamae, o que corroboraria com a ideia de que os Ephemeroptera apresentam uma área de vida bem mais abrangente do que aquela que se convencionou na literatura, ou a presença de populações na região localizada entre essas duas últimas, propiciando um *continuum* populacional.

3. Identidade de *Te. sooretamae*: presença de mais de uma espécie?

As populações de *Te. sooretamae* encontradas no Sudeste e no Nordeste mostram evidências de que se tratam de uma mesma espécie, com presença de fluxo gênico (Tabelas 12-13) e com valores de divergência para COI dentro do esperado para Ephemeroptera (Tabela 10) (Cardoni *et al.* 2015). Como a localidade-tipo encontra-se no Sudeste, no município de Alfredo Chaves, no estado do Espírito Santo (Boldrini *et al.*, 2009), assume-se que essas populações representam de fato a espécie *Te. sooretamae*.

Os indivíduos de Mato Grosso do Sul apresentaram uma divergência molecular muito alta em relação aos indivíduos das demais regiões, dados os valores elevados de distância par-a-par, principalmente nas análises com COII (Tabela 11). Outro fator importante é sua posição na árvore de máxima-verossimilhança, excluído do grupo formado pelos demais indivíduos de *Te. sooretamae*, onde espécies de outros gêneros, *Fittkaulus* e *Tikuna*, ficaram mais próximas de *Te. sooretamae* do que os indivíduos de Mato Grosso do Sul; essa conformação na árvore obteve um valor de *bootstrap* alto (*bootstrap* = 100) (Figura 16). O mais notável, porém, são os valores elevados de *Fst* (Tabelas 12-13), indicando que não há fluxo gênico entre Mato Grosso do Sul e os demais grupos (Sudeste, Nordeste e Mato Grosso) e é justamente o fluxo gênico entre populações que, se estivesse presente, impediria que as mesmas não evoluíssem em espécies distintas (Slatkin 1987). Além disso, esses espécimes apresentam uma diferença notável no padrão de coloração do abdome, não observada nos demais representantes da espécie. Essas alterações a nível molecular e morfológico permitem

questionar a identidade dos mesmos, levando a considerar a possibilidade de que os espécimes analisados possam vir a ser representantes de uma espécie distinta (espécie críptica).

Os indivíduos de Mato Grosso, por sua vez, parecem não estabelecer fluxo gênico, mas os valores encontrados não se encontram tão elevados como os observados para Mato Grosso do Sul (Tabelas 12-13). Além disso, Mato Grosso divergiu dos grupos do Sudeste e do Nordeste numa escala de tempo mais recente (Figura 17). Outro fator são os valores de distância par-a-par para COI em relação à demais regiões (Tabela 10), pois apresentam faixa de variação entre 0,02 e 0,03, ou seja, dentro da média de divergência intraespecífica esperada para Ephemeroptera, que é de 0,002 a 0,087 (Cardoni *et al.* 2015). Portanto, não há evidências suficientes de que a população amostrada de Mato Grosso represente uma espécie distinta.

CONCLUSÕES

As populações atribuídas a *Te. sooretamae* estão estruturadas em, no mínimo, três grandes grupos: Sudeste + Nordeste, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que esses grupos ora citados não mantêm mais fluxo gênico entre si.

Entretanto, as populações em geral de (Espírito Santo + Nordeste) apresentam altas taxas de fluxo gênico, apesar das grandes distâncias geográficas que os separam; portanto, para os indivíduos dessa espécie o fator limitante à dispersão em regiões continentais não é a distância geográfica, mas a ocorrência em ecossistemas distintos.

Quanto à identidade dos indivíduos atribuídos à *Te. sooretamae*, o caso dos representantes de Mato Grosso do Sul merece ser considerado, pois há uma grande chance de os mesmos representarem um espécie nova. Estudos envolvendo taxonomia são necessários, a fim de corroborar com a suspeita acima levantada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angeli KB, Rozário EMM, Salles FF (2015) Checklist of Ephemeroptera (Insecta) from São Mateus River Basin, Espírito Santo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **59**, 197–204.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Banhos A, Hrbek T, Sanaiotti TM, Farias IP (2016) Reduction of Genetic Diversity of the Harpy Eagle in Brazilian Tropical Forests. *PLoS ONE*, **11** (2), 1-12.
- Banks N (1900) New genera and species of Nearctic Neuropteroid insect. *Transactions of the American Entomological Society*, **26**, 239–259.
- Barber-James HM, Gattolliat JL, Sartori M, Hubbard MD (2008) Global diversity of mayflies (Ephemeroptera, Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 339–350.
- Barnard KH (1932) South African May-flies (Ephemeroptera). *Transactions of the Royal Society of South Africa*, **20** (3), 201-259.
- Boldrini R, Salles FF, Cabette, HRS (2009) Contribution to the taxonomy of the Terpidés lineage (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Annales de Limnologie. - International Journal of Limnologie*, **45**, 219–229.
- Brasil LS, Juen L, Cabette, HSR (2014) The effects of environmental integrity on the diversity of mayflies, Leptophlebiidae (Ephemeroptera), in tropical streams of the Brazilian Cerrado. *Annales de Limnologie. - International Journal of Limnologie*, **50**, 325–334.
- Britain JE, Sartoni M (2003) Ephemeroptera (Mayflies). In: Resh VH, Cardé RT (Eds.) *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, Amsterdam.
- Brown KS (2005) Geological, evolutionary, and ecological bases of the diversification of Neotropical butterflies: implications for conservation. In: Bermingham E, Dick CW,

- Moritz C (Eds.) Tropical Rainforest: Past, Present and Future. University of Chicago Press, Chicago.
- Buckup PA (2011) The Eastern Brazilian Shield. In: Albert JS, Reis RE (Eds.) *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press, Los Angeles.
- Cardoni S, Tenchini R, Ficulle I, Piredda R, Simeone MC, Belfiore C (2015) DNA barcode assessment of Mediterranean mayflies (Ephemeroptera), benchmark data for a regional reference library for rapid biomonitoring of freshwaters. *Biochemical Systematics and Ecology*, **62**, 36-50.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Science*, **323**, 785-789.
- Carnaval AC, Moritz C (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, **35**, 1187–1201.
- DaSilva MB, Pinto-da-Rocha R (2011) História biogeográfica da Mata Atlântica: Opiliões (Arachnida) como modelo para sua inferência. In: Carvalho CJB, Almeida EAB. *Biogeografia da América do Sul. Padrões e processos*. Roca, São Paulo.
- Demoulin G (1966) Contribution à l'étude des Éphéméroptères du Surinam. *Bulletin de Le Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique - Sciences De La Terre*, **42** (37), 1-22.
- Dixo M, Metzger JP, Morgante JS, Zamudio KR (2009) Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. *Biological Conservation*, **142**, 1560–1569.
- Domínguez E, Molineri C, Pescador M, Hubbard MD, Nieto C (2006) *Aquatic Biodiversity in Latin America, Vol. 2: Ephemeroptera of South America*. Pensoft, Sofia-Moscow.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3** (5), 294-299.
- Godunko RJ, Sroka P, Soldán T, Bojvoká J (2015) The higher phylogeny of Leptophlebiidae (Insecta: Ephemeroptera), with description of a new species of *Calliarcys* Eaton, 1881. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, **73** (2), 259-272.
- Haffer J (1969) Speciation in Amazonian Forest birds. *Science*, **165** (3889), 132-137.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M., Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28** (12), 1647–1649.
- Kluge NJ (2009) Higher system of Atalophlebiinae (Leptophlebiidae) with description of three new species of *Terpides* s.l. from Peruvian Amazonia. *Russian Entomological Journal*, **18** (4), 243-256.
- Kluge NJ (2015) Contribution to the knowledge of Terpidinae Kluge 2009 (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Zootaxa*, **3999** (2), 151-189.
- Laboratório de Sistemática e Ecologia de Insetos, LabSEI (2016) Ephemeroptera do Brasil, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, Espírito Santo. Disponível em: <http://www.ephemeroptera.com.br/>.
- Leach WE (1815) Entomology. *Brewster's Edinburgh Encyclopaedia*, **9**, 57-172.
- Leite YLR, Costa LP, Loss AC, Rocha RG, Batalha-Filho H, Bastos AC, Quaresma VS, Fagundes V, Paresque R, Passamani M, Pardini R. Neotropical forest expansion during the

- last glacial period challenges refuge hypothesis (2016) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, **113** (4), 1008-1013.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- Lima LRC, Salles FF, Pinheiro U (2012) Ephemeroptera (Insecta) from Pernambuco State, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **56** (3), 304–314.
- Lucentini L, Rebora M, Puletti ME, Gigliarelli L, Fontanetto D, Gaino E, Panara F (2011) Geographical and seasonal evidence of cryptic diversity in the *Baetis rhodani* complex (Ephemeroptera, Baetidae) revealed by means of DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, **673**, 215–228.
- Lugo-Ortiz CR, McCafferty WP (1996) New species of Leptophlebiidae (Ephemeroptera) from Mexico and Central America. *Annales de Limnologie*, **32** (1), 3-18.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Barros LAC, Mariano-Neto E, Campiolo S, Delabie JHC (2008) A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conservation and Diversity*, **1**, 161–168.
- Monaghan MT, Gattolliat JL, Sartori M, Elouard JM, James H, Derleth P, Glaizot O, Moor F, Vogler AP (2005) Trans-oceanic and endemic origins of the small minnow mayflies (Ephemeroptera, Baetidae) of Madagascar. *Proceedings of the Royal Society B*, **272**, 1829–1836.
- Needham JG, Murphy HE (1924) Neotropical mayflies. *Bulletin of the Lloyd Library Number*, **24** (4), 1-79.
- O'Donnell BC, Jockusch EL (2008) Phylogenetic relationships of leptophlebiid mayflies as inferred by histone H3 and 28S ribosomal DNA. *Systematic Entomology*, **33**, 651–667.

- Pereira-da-Conceicao LL, Price BJ, Barber-James HM, Barker NP, Moor FC, Villet MH (2012) Cryptic variation in an ecological indicator organism: mitochondrial and nuclear DNA sequence data confirm distinct lineages of *Baetis harrisoni* Barnard (Ephemeroptera: Baetidae) in southern Africa. *BMC Evolutionary Biology*, **12** (26), 1471-2148.
- Peters WL (1980) Phylogeny of the Leptophlebiidae (Ephemeroptera): an introduction. In: Flannigan JF, Marshall KE. *Advances in Ephemeroptera Biology*. Plenum Press, New York.
- Peters WL, Harrison AD (1974) Redescription of *Terpides* Demoulin from St. Vincent, West Indies (Ephemeroptera: Leptophlebiidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **76** (2), 178-185.
- Rutschmann S, Gattolliat JL, Hughes SJ, Báez M, Sartori M, Monaghan MT (2014) Evolution and island endemism of morphologically cryptic *Baetis* and *Cloeon* species (Ephemeroptera, Baetidae) on the Canary Islands and Madeira. *Freshwater Biology*, **59** (12), 1-12.
- Salles FF, Nascimento JMC, Massariol FC, Angeli KB, Silva PB, Rúdio JA, Boldrini R (2010) Primeiro levantamento da fauna de Ephemeroptera (Insecta) do Espírito Santo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, **10** (1), 293-307.
- Savage HM (1986) Systematics of the *Terpides* lineage from the Neotropics: Definition of the *Terpides* lineage, methods, and revision of *Fittkaulus* Savage & Peters. *Spixiana*, **9**, 255-270.
- Savage HM, Flowers RW, Porras VW (2005) Rediscovery of *Choroerpes atramentum* in Costa Rica, type species of *Tikuna* new genus (Ephemeroptera: Leptophlebiidae: Atalophlebiinae), and its role in the "Great American Interchange". *Zootaxa*, **932**, 1-14.
- Savage HM, Peters WL (1978) *Fittkaulus maculatus*: a new genus and species from northern Brazil (Leptophlebiidae: Ephemeroptera). *Acta Amazonica*, **8** (2), 293-298.

- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **85** (5), 651-701.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, **236**, 787-792.
- Sproul JS, Houston DD, Davis N, Barrington E, Oh SY, Evans RP, Shiozawa DK (2014) Comparative phylogeography of codistributed aquatic insects in western North America: insights into dispersal and regional patterns of genetic structure. *Freshwater Biology*, **59**, 2051–2063.
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers. *Systematic Biology*, **75** (5), 758-771.
- Takiya DM, Tran PL, Dietrich CH, Moran NA (2006) Co-cladogenesis spanning three phyla: leafhoppers (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae) and their dual bacterial symbionts. *Molecular Ecology*, **15**, 4175–4191.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.
- Thomaz AT, Malabarba LR, Bonatto SL, Knowles LL (2015) Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, **42**, 2389–2401.
- Traver JR (1947) Notes on Neotropical mayflies. Part II. Family Baetidae, subfamily Leptophlebiinae. *Revista de Entomologia*, **18**, 149-160.

- Vuataz L, Sartori M, Gattolliat JL, Monaghan MT (2013) Endemism and diversification in freshwater insects of Madagascar revealed by coalescent and phylogenetic analysis of museum and field collections. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **66**, 979–991.
- Williams HC, Ormerod SJ, Bruford MW (2006) Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **40**, 370–382.
- Xia X, Lemey P (2009) Assessing substitution saturation with DAMBE, 615-630. In Lemey P, Salemi M, Vandamme AM (Eds.) *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y (2003) An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **26**, 1-7.
- Zúñiga MC, Molineri C, Domínguez E, Cardona W (2015) Leptophlebiidae (Insecta: Ephemeroptera) from Gorgona Island National Natural Park (Tropical Eastern Pacific, Colombia) with the description of two new species. *Annales de Limnologie*, **51**, 281-296.

APÊNDICES

Apêndice I. Relação dos indivíduos utilizados que tiveram ao menos uma das regiões do DNA mitocondrial amplificado, com respectivo número de tombo na CZNC, número do espécime e localidades amostradas

Nº de tombo	Nº do espécime	Espécie	Localidade	Coordenadas geográficas
Ep-6416	Ep-6416A	<i>Terpides sooretamae</i>	Quebrangulo (AL), Bica da Juliana	9°14'21"S;36°27'11,7"W
Ep-6417	Ep-6417	<i>Terpides sooretamae</i>	Quebrangulo (AL), Bica da Juliana	9°14'21"S;36°27'11,7"W
Ep-6344	Ep-6344A	<i>Terpides sooretamae</i>	Afonso Cláudio (ES), Cachoeira Santa Luzia	20°9'19.9"S;41°8'32.3"W
Ep-2066	Ep-2066	<i>Terpides sooretamae</i>	Afonso Cláudio (ES), Cachoeira Santa Luzia	20°9'19.9"S;41°8'32.3"W
Ep-6343	Ep-6343A	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6343	Ep-6343B	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6343	Ep-6343C	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6345	Ep-6345A	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6345	Ep-6345B	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6345	Ep-6345C	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6345	Ep-6345D	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6345	Ep-6345E	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W
Ep-6346	Ep-6346A	<i>Terpides sooretamae</i>	Alfredo Chaves (ES), Junção Rio Benevente	20°37'53.2"S;40°45'43.98"W

Nº de tombo	Nº do espécime	Espécie	Localidade	Coordenadas geográficas
Ep-3637	Ep-3637A	<i>Terpides sooretamae</i>	Colatina (ES), Cachoeira do 8	19°28'13.8"S;40°36'40.7"W
Ep-3637	Ep-3637F	<i>Terpides sooretamae</i>	Colatina (ES), Cachoeira do 8	19°28'13.8"S;40°36'40.7"W
Ep-3637	Ep-3637G	<i>Terpides sooretamae</i>	Colatina (ES), Cachoeira do 8	19°28'13.8"S;40°36'40.7"W
Ep-3637	Ep-3637J	<i>Terpides sooretamae</i>	Colatina (ES), Cachoeira do 8	19°28'13.8"S;40°36'40.7"W
Ep-3637	Ep-3637K	<i>Terpides sooretamae</i>	Colatina (ES), Cachoeira do 8	19°28'13.8"S;40°36'40.7"W
Ep-3637	Ep-3637L	<i>Terpides sooretamae</i>	Colatina (ES), Cachoeira do 8	19°28'13.8"S;40°36'40.7"W
Ep-3637	Ep-3637M	<i>Terpides sooretamae</i>	Colatina (ES), Cachoeira do 8	19°28'13.8"S;40°36'40.7"W
Ep-6553	Ep-6553A	<i>Terpides sooretamae</i>	Domingos Martins (ES), Panelas, Rio Jucu	20°18'59.5"S;40°39'24.4"W
Ep-6553	Ep-6553B	<i>Terpides sooretamae</i>	Domingos Martins (ES), Panelas, Rio Jucu	20°18'59.5"S;40°39'24.4"W
Ep-3622	Ep-3622A	<i>Terpides sooretamae</i>	Ibiraçu (ES), Cachoeirão	19°53'23.4"S; 40°25'42"W
Ep-6347	Ep-6347	<i>Terpides sooretamae</i>	Ibitirama (ES), Cachoeira Ponte do Araçá	20°34'09.9"S;41°38'49.5"W
Ep-6541	Ep-6541	<i>Terpides sooretamae</i>	Ibitirama (ES), Cachoeira do Firmino	20°37'11.4"S; 41°37'35.4"W
Ep-3635	Ep-3635F	<i>Terpides sooretamae</i>	Iconha (ES), Cachoeira do Meio	20°48'49.9"S; 40°51'25"W
Ep-3635	Ep-3635G	<i>Terpides sooretamae</i>	Iconha (ES), Cachoeira do Meio	20°48'49.9"S; 40°51'25"W
Ep-3635	Ep-3635H	<i>Terpides sooretamae</i>	Iconha (ES), Cachoeira do Meio	20°48'49.9"S; 40°51'25"W
Ep-3635	Ep-3635I	<i>Terpides sooretamae</i>	Iconha (ES), Cachoeira do Meio	20°48'49.9"S; 40°51'25"W

Nº de tombo	Nº do espécime	Espécie	Localidade	Coordenadas geográficas
Ep-3643	Ep-3643A	<i>Terpides sooretamae</i>	Iconha (ES), Cachoeira do Meio	20°48'49.9"S; 40°51'25"W
Ep-3640	Ep-3640B	<i>Terpides sooretamae</i>	Jaguaré (ES), Cachoeira do Bereco	18°53'04.46"S; 40°12'23.14"W
Ep-3640	Ep-3640D	<i>Terpides sooretamae</i>	Jaguaré (ES), Cachoeira do Bereco	18°53'04.46"S; 40°12'23.14"W
Ep-3640	Ep-3640F	<i>Terpides sooretamae</i>	Jaguaré (ES), Cachoeira do Bereco	18°53'04.46"S; 40°12'23.14"W
Ep-3633	Ep-3633A	<i>Terpides sooretamae</i>	João Neiva (ES), Acioli, Rio Ubás	19°41'09.5"S; 40°28'37.2"W
Ep-3620	Ep-3620E	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Venécia (ES), Santa Rita do Pip Nuck	18°39'51.4"S; 40°30'44.9"W
Ep-3620	Ep-3620F	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Venécia (ES), Santa Rita do Pip Nuck	18°39'51.4"S; 40°30'44.9"W
Ep-5205	Ep-5205B	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Venécia (ES), Santa Rita do Pip Nuck	18°39'51.4"S; 40°30'44.9"W
Ep-5205	Ep-5205C	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Venécia (ES), Santa Rita do Pip Nuck	18°39'51.4"S; 40°30'44.9"W
Ep-5135	Ep-5135	<i>Terpides sooretamae</i>	Pancas (ES), Cachoeira do Giles	19°03'02.5"S; 40°52'27.9"W
Ep-3621	Ep-3621A	<i>Terpides sooretamae</i>	São Gabriel da Palha (ES), Rio São José	19°2'53.1"S; 40°35'35.7"W
Ep-3621	Ep-3621B	<i>Terpides sooretamae</i>	São Gabriel da Palha (ES), Rio São José	19°2'53.1"S; 40°35'35.7"W
Ep-6548	Ep-6548A	<i>Terpides sooretamae</i>	São Gabriel da Palha (ES), Rio São José	19°2'53.1"S; 40°35'35.7"W
Ep-6548	Ep-6548B	<i>Terpides sooretamae</i>	São Gabriel da Palha (ES), Rio São José	19°2'53.1"S; 40°35'35.7"W
Ep-6548	Ep-6548C	<i>Terpides sooretamae</i>	São Gabriel da Palha (ES), Rio São José	19°2'53.1"S; 40°35'35.7"W
Ep-6548	Ep-6548D	<i>Terpides sooretamae</i>	São Gabriel da Palha (ES), Rio São José	19°2'53.1"S; 40°35'35.7"W
Ep-6049	Ep-6049A	<i>Terpides sooretamae</i>	São Mateus (ES), Rio Cotaxé, Cachoeira Japira	18°34'39.1"S; 40°16'58.0"W

Nº de tombo	Nº do espécime	Espécie	Localidade	Coordenadas geográficas
Ep-1456	Ep-1456A	<i>Terpides sooretamae</i>	Sooretama (ES), Rio São José	19°07'33.1"S; 40°14'26.1"W
Ep-2190	Ep-2190D	<i>Terpides sooretamae</i>	Sooretama (ES), Rio São José	19°07'33.1"S; 40°14'26.1"W
Ep-5133	Ep-5133B	<i>Terpides sooretamae</i>	Sooretama (ES), Rio São José	19°07'33.1"S; 40°14'26.1"W
Ep-5133	Ep-5133E	<i>Terpides sooretamae</i>	Sooretama (ES), Rio São José	19°07'33.1"S; 40°14'26.1"W
Ep-5133	Ep-5133F	<i>Terpides sooretamae</i>	Sooretama (ES), Rio São José	19°07'33.1"S; 40°14'26.1"W
Ep-5134	Ep-5134A	<i>Terpides sooretamae</i>	Sooretama (ES), Rio São José	19°07'33.1"S; 40°14'26.1"W
Ep-5134	Ep-5134B	<i>Terpides sooretamae</i>	Sooretama (ES), Rio São José	19°07'33.1"S; 40°14'26.1"W
Ep-6539	Ep-6539B	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Xavantina(MT), Córrego da Mata	14°59'59"S;52°26'29"W
Ep-6539	Ep-6539D	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Xavantina(MT), Córrego da Mata	14°59'59"S;52°26'29"W
Ep-6539	Ep-6539E	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Xavantina(MT), Córrego da Mata	14°59'59"S;52°26'29"W
Ep-6539	Ep-6539G	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Xavantina(MT), Córrego da Mata	14°59'59"S;52°26'29"W
Ep-6609	Ep-6609B	<i>Terpides sooretamae</i>	Bodoquena (MS), Rodovia MS 339, Córrego Serra	20°30'0.1"S;56°52'22.8"W
Ep-6609	Ep-6609C	<i>Terpides sooretamae</i>	Bodoquena (MS), Rodovia MS 339, Córrego Serra	20°30'0.1"S;56°52'22.8"W
Ep-6612	Ep-6612A	<i>Terpides sooretamae</i>	Caracol (MS), Rodovia BR-267/MS, Córrego Azul	21°40'51.4"S;56°45'45.9"W

Nº de tombo	Nº do espécime	Espécie	Localidade	Coordenadas geográficas
Ep-6612	Ep-6612C	<i>Terpides sooretamae</i>	Caracol (MS), Rodovia BR-267/MS, Córrego Azul	21°40'51.4"S;56°45'45.9"W
Ep-6612	Ep-6612E	<i>Terpides sooretamae</i>	Caracol (MS), Rodovia BR-267/MS, Córrego Azul	21°40'51.4"S;56°45'45.9"W
Ep-3642	Ep-3642A	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Belém (MG), Cachoeira do Rodão	18°27'38"S;41°6'33.2"W
Ep-3642	Ep-3642B	<i>Terpides sooretamae</i>	Nova Belém (MG), Cachoeira do Rodão	18°27'38"S;41°6'33.2"W
Ep-6410	Ep-6410A	<i>Terpides sooretamae</i>	Amaraji (PE), Rio Amaraji próx. Usina Campo Belo	8°21'48.9"S;35°48'29"W
Ep-6403	Ep-6403	<i>Terpides sooretamae</i>	Amaraji (PE), Rio Amaraji, Cach. Rio Morto	8°20'59.1"S;35°30'21"W
Ep-6408	Ep-6408B	<i>Terpides sooretamae</i>	Amaraji (PE), Rio Amaraji, Cach. Rio Morto	8°20'59.1"S;35°30'21"W
Ep-6427	Ep-6427B	<i>Terpides sooretamae</i>	Amaraji (PE), Rio Amaraji, Cach. Rio Morto	8°20'59.1"S;35°30'21"W
Ep-6406	Ep-6406	<i>Terpides sooretamae</i>	Bonito (PE), Rio Verdinho, Cachoeira da Corrente	8°34'40"S;35°41'54.3"W
Ep-6407	Ep-6407	<i>Terpides sooretamae</i>	Bonito (PE), Rio Verdinho, Cachoeira da Corrente	8°34'40"S;35°41'54.3"W
Ep-6409	Ep-6409A	<i>Terpides sooretamae</i>	Bonito (PE), Rio Verdinho, Cachoeira da Corrente	8°34'40"S;35°41'54.3"W

Nº de tombo	Nº do espécime	Espécie	Localidade	Coordenadas geográficas
Ep-6409	Ep-6409B	<i>Terpides sooretamae</i>	Bonito (PE), Rio Verdinho, Cachoeira da Corrente	8°34'40"S;35°41'54.3"W
Ep-6409	Ep-6409C	<i>Terpides sooretamae</i>	Bonito (PE), Rio Verdinho, Cachoeira da Corrente	8°34'40"S;35°41'54.3"W
Ep-6418	Ep-6418	<i>Terpides sooretamae</i>	Bonito (PE), Rio Verdinho, Cachoeira da Corrente	8°34'40"S;35°41'54.3"W
Ep-6412	Ep-6412	<i>Terpides sooretamae</i>	São Benedito do Sul (PE), Poço do Caboclo	8°45'53.4"S;35°55'16.1"W
Ep-6413	Ep-6413	<i>Terpides sooretamae</i>	São Benedito do Sul (PE), Poço do Caboclo	8°45'53.4"S;35°55'16.1"W
Ep-6419	Ep-6419	<i>Fittkaulus cururuensis</i>	Quebrangulo (AL), Bica da Juliana	9°14'21"S;36°27'11,7"W
Ep-6423	Ep-6423	<i>Fittkaulus cf. amazonicus</i>	Amaraji (PE), Rio Amaraji próx. Usina Campo Belo	8°21'48.9"S;35°48'29"W
Ep-6546	Ep-6546A	<i>Fittkaulus maculatus</i>	Igarassu (PE), Riacho Jacocá, Refúgio Charles Darwin	7°48'57.5"S;34°57'19.1"W
Ep-6546	Ep-6546B	<i>Fittkaulus maculatus</i>	Igarassu (PE), Riacho Jacocá, Refúgio Charles Darwin	7°48'57.5"S;34°57'19.1"W
Ep-4502	Ep-4502	<i>Tikuna bilineata</i>	Nova Venécia (ES), Santa Rita do Pip Nuck	18°39'51.4"S; 40°30'44.9"W
Ep-4503	Ep-4503	<i>Tikuna bilineata</i>	Nova Venécia (ES), Patrimônio do Bis	18°33'27.5"S; 40°20'6.5"W

Apêndice II. Lista de haplótipos dos genes COI e COII (Apenas para *Terpides sooretamae*)

Lista de haplótipos do gene COI

Haplótipo	N	Espécime (s)	Localidade (s)	População/Grupo
Hap_1	1	Ep-6343B	Alfredo Chaves-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_2	1	Ep-6343A	Alfredo Chaves-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_3	14	Ep-6345A, Ep-6345B, Ep-6345C, Ep-6345D, Ep-6345E, Ep-3637F, Ep-3637J, Ep-6553A, Ep6541, Ep-6347, Ep-5205B, Ep-3621A, Ep6548D, Ep6049A	Alfredo Chaves-ES, Colatina-ES, Domingos Martins-ES, Ibitirama-ES (Cachoeira do Firmino e Cachoeira Ponte do Araçá), Nova Venécia-ES, São Gabriel da Palha-ES, São Mateus-ES	Benevente, Doce, Jucu, Itapemirim e São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_4	5	Ep-6344A, Ep-3622A, Ep-3635F, Ep-6548C, Ep3642A	Afonso Cláudio-ES, Ibirapu-ES, Iconha-ES, Nova Belém-MG, São Gabriel da Palha-ES	Benevente, Piraquê-Açú, São Mateus e Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_5	2	Ep-3637L, Ep-3635H	Colatina-ES, Iconha-ES	Doce, Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_6	1	Ep-3637M	Colatina-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_7	1	Ep-6553B	Domingos Martins-ES	Jucu/ <u>Sudeste</u>
Hap_8	1	Ep-3633A	João Neiva-ES	Piraquê-Açú/ <u>Sudeste</u>
Hap_9	1	Ep-3620E	Nova Venécia-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_10	1	Ep-5205C	Nova Venécia-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_11	1	Ep-5135	Pancas-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_12	1	Ep-6548B	São Gabriel da Palha-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_13	1	Ep-6548A	São Gabriel da Palha-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_14	1	Ep-1456A	Sooretama-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_15	1	Ep-5133F	Sooretama-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_16	2	Ep-5134A, Ep-5134B	Sooretama-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_17	1	Ep-3642B	Nova Belém-MG	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_18	8	Ep-6403, Ep-6408B, Ep-6427B, Ep-6406, Ep-6407, Ep-6409A, Ep-6409C, Ep6416A	Amaraji-PE (Cachoeira do Rio Morto), Bonito-PE, Quebrangulo-AL	Serinhaém, Una e Mundaú/ <u>Nordeste</u>
Hap_19	1	Ep-6409B	Bonito-PE	Una/ <u>Nordeste</u>

Haplótipo	N	Espécime (s)	Localidade (s)	População/Grupo
Hap_20	1	Ep-6418	Bonito-PE	Una/Nordeste
Hap_21	1	Ep-6413	São Benedito do Sul-PE	Una/ <u>Nordeste</u>
Hap_22	1	Ep-6417	Quebrangulo-AL	Mundaú/ <u>Nordeste</u>
Hap_23	1	Ep-6539G	Nova Xavantina-MT	Araguaia/ <u>Mato Grosso</u>
Hap_24	1	Ep-6539E	Nova Xavantina-MT	Araguaia/ <u>Mato Grosso</u>
Hap_25	1	Ep-6539B	Nova Xavantina-MT	Araguaia/ <u>Mato Grosso</u>
Hap_26	1	Ep-6612A	Caracol-MS	Apa/ <u>Mato Grosso do Sul</u>
Hap_27	1	Ep-6612E	Caracol-MS	Apa/ <u>Mato Grosso do Sul</u>
Hap_28	1	Ep-6612F	Caracol-MS	Apa/ <u>Mato Grosso do Sul</u>

Lista de haplótipos do gene COII

Haplótipo	N	Espécime (s)	Localidade (s)	População/Grupo
Hap_1	13	Ep-6343A, Ep-6343C, Ep-6345C, Ep-3637A, Ep-3637J, Ep-6553A, Ep-3640F, Ep-6548A, Ep-6548B Ep-6548C, Ep-6548D, Ep-5133B, Ep-6406	Alfredo Chaves-ES, Colatina-ES, Domingos Martins-ES, Jaguaré-ES, São Gabriel da Palha-ES, Sooretama-ES e Bonito-PE	Benevente, Doce e Jucu/ <u>Sudeste</u> Una/ <u>Nordeste</u>
Hap_2	1	Ep-6343B	Alfredo Chaves-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_3	2	Ep-6345A, Ep-5133E	Alfredo Chaves-ES, Sooretama-ES	Benevente e Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_4	1	Ep-6345D	Alfredo Chaves-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_5	1	Ep-6345E	Alfredo Chaves-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_6	1	Ep-6346A	Alfredo Chaves-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_7	1	Ep-3637G	Colatina-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_8	1	Ep-3637K	Colatina-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_9	1	Ep-3637L	Colatina-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_10	1	Ep-3637M	Colatina-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_11	1	Ep-6553B	Domingos Martins-ES	Jucu/ <u>Sudeste</u>
Hap_12	1	Ep-3622A	Ibiraçu-ES	Piraquê-Açu/ <u>Sudeste</u>
Hap_13	1	Ep-6541	Ibitirama-ES (Cachoeira do Firmino)	Itapemirim/ <u>Sudeste</u>
Hap_14	1	Ep-3635F	Iconha-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_15	1	Ep-3635G	Iconha-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_16	1	Ep-3635H	Iconha-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_17	1	Ep-3635I	Iconha-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_18	1	Ep-3643A	Iconha-ES	Benevente/ <u>Sudeste</u>
Hap_19	1	Ep-3640B	Jaguaré-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_20	1	Ep-3640D	Jaguaré-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_21	1	Ep-3633A	João Neiva-ES	Piraquê-Açu/ <u>Sudeste</u>
Hap_22	1	Ep-3620B	Nova Venécia-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>

Haplótipo	N	Espécime (s)	Localidade (s)	População/Grupo
Hap_23	1	Ep-3620E	Nova Venécia-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_24	1	Ep-3620F	Nova Venécia-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_25	1	Ep-5205B	Nova Venécia-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_26	1	Ep-5205C	Nova Venécia-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_27	1	Ep-5135	Pancas-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_28	1	Ep-3621A	São Gabriel da Palha-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_29	1	Ep-3621B	São Gabriel da Palha-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_30	1	Ep-6049A	São Mateus-ES	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_31	1	Ep-1456A	Sooretama-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_32	1	Ep-2190D	Sooretama-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_33	1	Ep-5133F	Sooretama-ES	Doce/ <u>Sudeste</u>
Hap_34	1	Ep-3642A	Nova Belém-MG	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_35	1	Ep-3642B	Nova Belém-MG	São Mateus/ <u>Sudeste</u>
Hap_36	1	Ep-6403	Amaraji-PE (Cachoeira Rio Morto)	Serinhaém/ <u>Nordeste</u>
Hap_37	1	Ep-6427A	Amaraji-PE (Cachoeira Rio Morto)	Serinhaém/ <u>Nordeste</u>
Hap_38	1	Ep-6427B	Amaraji-PE (Cachoeira Rio Morto)	Serinhaém/ <u>Nordeste</u>
Hap_39	1	Ep-6408B	Amaraji-PE (Cachoeira Rio Morto)	Serinhaém/ <u>Nordeste</u>
Hap_40	1	Ep-6407	Amaraji-PE (Cachoeira Rio Morto)	Serinhaém/ <u>Nordeste</u>
Hap_41	1	Ep-6409B	Bonito-PE	Una/ <u>Nordeste</u>
Hap_42	1	Ep-6409C	Bonito-PE	Una/ <u>Nordeste</u>
Hap_43	1	Ep-6418	Bonito-PE	Una/ <u>Nordeste</u>
Hap_44	1	Ep-6405B	São Benedito do Sul-PE	Una/ <u>Nordeste</u>

Haplótipo	N	Espécime (s)	Localidade (s)	População/Grupo
Hap_45	1	Ep-6412	São Benedito do Sul-PE	Una/ <u>Nordeste</u>
Hap_46	1	Ep-6413	São Benedito do Sul-PE	Una/ <u>Nordeste</u>
Hap_47	1	Ep-6416A	Quebrangulo-AL	Mundaú/ <u>Nordeste</u>
Hap_48	1	Ep-6417	Quebrangulo-AL	Mundaú/ <u>Nordeste</u>
Hap_49	1	Ep-6539B	Nova Xavantina-MT	Araguaia/ <u>Mato Grosso</u>
Hap_50	1	Ep-6539D	Nova Xavantina-MT	Araguaia/ <u>Mato Grosso</u>
Hap_51	1	Ep-6539E	Nova Xavantina-MT	Araguaia/ <u>Mato Grosso</u>
Hap_52	1	Ep-6539G	Nova Xavantina-MT	Araguaia/ <u>Mato Grosso</u>
Hap_53	1	Ep-6609B	Bodoquena-MS	Miranda/ <u>Mato G. do Sul</u>
Hap_54	4	Ep-6609C, Ep-6642B, Ep-6613, Ep-6612E	Bodoquena-MS, Bonito-MS, Caracol-MS	Miranda e Apa/ <u>Mato G. do Sul</u>
Hap_55	1	Ep-6612A	Caracol-MS	Apa/ <u>Mato G. do Sul</u>
Hap_56	1	Ep-6612C	Caracol-MS	Apa/ <u>Mato G. do Sul</u>